

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

| | |
|---|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 06 octobre 2000 (06.10.00) | |
| Demande internationale no PCT/FR00/00430 | Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340624/18032 |
| Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 février 2000 (21.02.00) | Date de priorité (jour/mois/année) 22 février 1999 (22.02.99) |
| Déposant KOEHL, Michel etc | |

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

11 septembre 2000 (11.09.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé

Kiwa Mpay

no de téléphone: (41-22) 338.83.38

TRAITE D'COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

NOTIFICATION DE L'ENREGISTREMENT
D'UN CHANGEMENT(règle 92bis.1 et
instruction administrative 422 du PCT)

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, rue de Chazelles
F-75847 Paris Cedex 17
FRANCE

| | |
|---|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 09 mars 2001 (09.03.01) | NOTIFICATION IMPORTANTE |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340624/18032 | |
| Demande internationale no PCT/FR00/00430 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 février 2000 (21.02.00) |

| | | |
|---|--|---|
| 1. Les renseignements suivants étaient enregistrés en ce qui concerne: | | |
| <input type="checkbox"/> le déposant | <input type="checkbox"/> l'inventeur | <input checked="" type="checkbox"/> le mandataire |
| <input type="checkbox"/> le représentant commun | | |
| Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 26, avenue Kléber F-75116 Paris FRANCE | Nationalité (nom de l'Etat) | Domicile (nom de l'Etat) |
| | no de téléphone 01-45-00-92-02 | |
| | no de télécopieur 01-45-00-46-12 | |
| | no de téléimprimeur | |
| 2. Le Bureau international notifie au déposant que le changement indiqué ci-après a été enregistré en ce qui concerne: | | |
| <input type="checkbox"/> la personne | <input type="checkbox"/> le nom | <input checked="" type="checkbox"/> l'adresse |
| <input type="checkbox"/> la nationalité | | |
| <input type="checkbox"/> le domicile | | |
| Nom et adresse MARTIN, Jean-Jacques Cabinet Regimbeau 20, rue de Chazelles F-75847 Paris Cedex 17 FRANCE | Nationalité (nom de l'Etat) | Domicile (nom de l'Etat) |
| | no de téléphone 01-44-29-35-00 | |
| | no de télécopieur 01-44-29-35-99 | |
| | no de téléimprimeur | |
| 3. Observations complémentaires, le cas échéant: | | |
| 4. Une copie de cette notification a été envoyée: | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> à l'office récepteur | <input type="checkbox"/> aux offices désignés concernés | |
| <input type="checkbox"/> à l'administration chargée de la recherche internationale | <input checked="" type="checkbox"/> aux offices élus concernés | |
| <input checked="" type="checkbox"/> à l'administration chargée de l'examen préliminaire international | <input type="checkbox"/> autre destinataire: | |

| | |
|--|--|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse | Fonctionnaire autorisé: Sean Taylor |
| no de télécopieur (41-22) 740.14.35 | no de téléphone (41-22) 338.83.38 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/FR 00/00430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N/02 B01D15/08 B01J8/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N B01D B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 September 1996 (1996-09-12) the whole document | 1-10 |
| X | WO 97 08298 A (GENZYME CORP ; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 March 1997 (1997-03-06) the whole document | 1-10 |
| X | WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 February 1997 (1997-02-20) the whole document | 1-10 |
| X | US 5 522 993 A (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 June 1996 (1996-06-04) cited in the application the whole document | 1-10 |
| -/- | | |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2000

Date of mailing of the international search report

25/05/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/FR 00/00430

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | DE 41 28 953 A (BASF AG) 4 March 1993 (1993-03-04) | 1-10 |
| A | HARUNA I ET AL: "SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE" VIROLOGY, vol. 13, 1 January 1961 (1961-01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822 | 1-10 |
| A | EP 0 328 256 A (OWENS CORNING FIBERGLASS CORP) 16 August 1989 (1989-08-16) abstract * exemples * | 1-10 |
| A | WO 89 08500 A (ROBINSON ERIC) 21 September 1989 (1989-09-21) the whole document | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Intern. Application No

PCT/FR 00/00430

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|--|--|
| WO 9627677 A | 12-09-1996 | US 5837520 A AU 5421396 A CA 2214837 A EP 0813606 A | 17-11-1998 23-09-1996 12-09-1996 29-12-1997 |
| WO 9708298 A | 06-03-1997 | AU 7010896 A CA 2230655 A EP 0847442 A JP 11511326 T | 19-03-1997 06-03-1997 17-06-1998 05-10-1999 |
| WO 9706243 A | 20-02-1997 | FR 2737730 A AU 712490 B AU 6496496 A BR 9609837 A CA 2226312 A CN 1199419 A EP 0848752 A NZ 313213 A US 6008036 A | 14-02-1997 11-11-1999 05-03-1997 09-03-1999 20-02-1997 18-11-1998 24-06-1998 29-03-1999 28-12-1999 |
| US 5522993 A | 04-06-1996 | EP 0538467 A EP 0922489 A JP 2807691 B JP 6500050 T WO 9218237 A | 28-04-1993 16-06-1999 08-10-1998 06-01-1994 29-10-1992 |
| DE 4128953 A | 04-03-1993 | WO 9305144 A MX 9204984 A | 18-03-1993 01-04-1993 |
| EP 0328256 A | 16-08-1989 | JP 2006750 A | 10-01-1990 |
| WO 8908500 A | 21-09-1989 | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demr internationale No

PCT/FR 00/00430

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N7/02 B01D15/08 B01J8/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N B01D B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| X | WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 septembre 1996 (1996-09-12) le document en entier | 1-10 |
| X | WO 97 08298 A (GENZYME CORP ; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 mars 1997 (1997-03-06) le document en entier | 1-10 |
| X | WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 février 1997 (1997-02-20) le document en entier | 1-10 |
| X | US 5 522 993 A (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 juin 1996 (1996-06-04) cité dans la demande le document en entier | 1-10 |

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No
PCT/FR 00/00430

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | DE 41 28 953 A (BASF AG) 4 mars 1993 (1993-03-04) | 1-10 |
| A | HARUNA I ET AL: "SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE" VIROLOGY, vol. 13, 1 janvier 1961 (1961-01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822 | 1-10 |
| A | EP 0 328 256 A (OWENS CORNING FIBERGLASS CORP) 16 août 1989 (1989-08-16) abrégé * exemples * | 1-10 |
| A | WO 89 08500 A (ROBINSON ERIC) 21 septembre 1989 (1989-09-21) le document en entier | 1-10 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

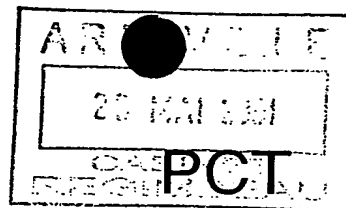
Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 00/00430

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|------------------------|--|--|
| WO 9627677 | A | 12-09-1996 | US 5837520 A AU 5421396 A CA 2214837 A EP 0813606 A | 17-11-1998 23-09-1996 12-09-1996 29-12-1997 |
| WO 9708298 | A | 06-03-1997 | AU 7010896 A CA 2230655 A EP 0847442 A JP 11511326 T | 19-03-1997 06-03-1997 17-06-1998 05-10-1999 |
| WO 9706243 | A | 20-02-1997 | FR 2737730 A AU 712490 B AU 6496496 A BR 9609837 A CA 2226312 A CN 1199419 A EP 0848752 A NZ 313213 A US 6008036 A | 14-02-1997 11-11-1999 05-03-1997 09-03-1999 20-02-1997 18-11-1998 24-06-1998 29-03-1999 28-12-1999 |
| US 5522993 | A | 04-06-1996 | EP 0538467 A EP 0922489 A JP 2807691 B JP 6500050 T WO 9218237 A | 28-04-1993 16-06-1999 08-10-1998 06-01-1994 29-10-1992 |
| DE 4128953 | A | 04-03-1993 | WO 9305144 A MX 9204984 A | 18-03-1993 01-04-1993 |
| EP 0328256 | A | 16-08-1989 | JP 2006750 A | 10-01-1990 |
| WO 8908500 | A | 21-09-1989 | AUCUN | |

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
L'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



FFP

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, Rue de Chazelles
75847 Paris CEDEX 17
FRANCE

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL (règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition
(jour/mois/année) 22.05.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
340624/18032

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.
PCT/FR00/00430

Date du dépôt international (jour/mois/année)
21/02/2000

Date de priorité (jour/mois/année)
22/02/1999

Déposant
TRANSGENE S.A. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.
2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.
3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen
préliminaire international



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

CLEERE, C

Tél. +49 89 2399-8061



TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL



(article 36 et règle 70 du PCT)

| | | |
|--|--|--|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340624/18032 | POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416) | |
| Demande internationale n° PCT/FR00/00430 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/02/2000 | Date de priorité (jour/mois/année) 22/02/1999 |
| Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N7/02 | | |
| Déposant TRANSGENE S.A. et al. | | |

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 3 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:
 - I ☒ Base du rapport
 - II ☐ Priorité
 - III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
 - IV ☐ Absence d'unité de l'invention
 - V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
 - VI ☐ Certains documents cités
 - VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
 - VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

| | |
|--|--|
| Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 11/09/2000 | Date d'achèvement du présent rapport 22.05.2001 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Fonctionnaire autorisé Vix, O N° de téléphone +49 89 2399 7326  |

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-30 version initiale

Revendications, N°:

1-11 reçue(s) avec télécopie du 07/07/2000

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00430

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

| | |
|--|---------------------------|
| Nouveauté | Oui : Revendications 1-11 |
| | Non : Revendications |
| Activité inventive | Oui : Revendications |
| | Non : Revendications 1-11 |
| Possibilité d'application industrielle | Oui : Revendications 1-11 |
| | Non : Revendications |

**2. Citations et explications
voir feuille séparée**

Concernant le point I**Base de l'opinion**

Les modifications soumises par lettre datée du 07 Juillet 2000. ne semblent pas aller au-delà de l'exposé de l'invention figurant dans la demande telle qu'elle a été déposée (Article 34(2)(b) PCT).

Le nouveau jeu de revendications 1-11 est considéré admissible et sera utilisé pour la suite de l'examen.

Concernant le point V

Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Il est fait référence aux documents suivants:

- D1: WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 septembre 1996 (1996-09-12)
- D2: WO 97 08298 A (GENZYME CORP ;RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 mars 1997 (1997-03-06)
- D3: WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 février 1997 (1997-02-20)
- D4: US-A-5 522 993 (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 juin 1996 (1996-06-04) cité dans la demande
- D5: HARUNA I ET AL: 'SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE' VIROLOGY, vol. 13, 1 janvier 1961 (1961- 01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822

Document cité par l'examineur (une copie est attachée en annexe):

D6: Hjorth R. : 'Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments' Trends Biotechnol. 1997, Jun, 15(6): 230-5

2. Nouveauté (Art. 33(2) PCT)

Le procédé de purification mettant en jeu une étape d'adsorption en lit fluidisé (également appelé en anglais "Expanded-Bed Adsorption" ou "EBA") est connu dans le domaine de la purification des protéines ou oligonucléotides. Cependant, aucun document de l'art antérieur cité dans le rapport de recherche ne mentionne l'utilisation de cette technique particulière pour la purification d'une préparation virale. Les revendications 1-11 sont considérées nouvelles au sens de l'Article 33(2) PCT.

3. Activité inventive (Art. 33(3) PCT)

Le document D2 décrit la purification d'adénovirus ou AAV (en vue d'utilisation en thérapie génique) par des méthodes de chromatographie classique (utilisation de résines classiques adaptées - en "batch" ou "flow-through" - dans le but d'éviter des dommages de la particule virale, voir D2 pages 4-6).

La différence entre la présente demande et D2 réside dans l'utilisation d'une nouvelle étape de chromatographie, à savoir un procédé utilisant une étape d'adsorption "en lit fluidisé".

Le problème technique consiste à trouver une méthode de purification alternative d'une préparation virale utilisable dans le domaine de la thérapie génique.

La technique particulière de chromatographie d'adsorption en lit fluidisé est connue (cf D4) et elle est utilisée dans le domaine de la purification des protéines comme le rapporte également le documents D6.

Les préparations virales sont généralement purifiées par des étapes de chromatographie "classiques" (cf exemples dans les documents D1-D3 et D5).

Cependant, il est connu dans le domaine de la technique que la purification de matériel biologique doit se faire le plus rapidement possible pour empêcher une quelconque dégradation et ainsi optimiser les chances de conserver l'intégrité du matériel biologique à séparer. Parallèlement, les débris cellulaires issus de la lyse des lignées cellulaires produisant les particules virales sont également connus pour leur capacité à colmater les colonnes de chromatographie classique. L'utilisation de la chromatographie en "en lit fluidisé" pour la purification de vecteurs viraux est

mentionnée en D1. Par ailleurs, D6 mentionne clairement les avantages de cette technique de chromatographie d'adsorption en lit fluidisé pour la clarification des homogénats cellulaires, la grande rapidité de purification des produits ainsi que l'utilisation d'équipements similaires à la chromatographie classique. Par exemple, les groupements connus pour les techniques d'échange d'ions en chromatographie classique sont utilisés en chromatographie d'adsorption en lit fluidisé. De même, la chromatographie d'affinité connue pour être efficace pour la purification de particules virales en chromatographie classique (cité en D2 page 6) existe en lit fluidisé (purification d'anticorps mentionnée en D6).

Hors mis une taille plus importante à l'échelle atomique, ces particules virales sont constituées d'un assemblage complexe de protéines virales protégeant le matériel génétique du virus et sont régies par les mêmes règles physico-chimiques que des molécules plus simples (telles que protéines recombinantes ou oligonucléotides purifiés par "EBA" dans l'art antérieur).

L'homme de métier serait par conséquent incité à utiliser ces informations pour combiner les avantages des deux techniques et aboutir ainsi à une étape de chromatographie d'adsorption en lit fluidisé "d'affinité" ou "classique" pour la purification de préparation virale. En absence d'effet inattendu, les conditions et paramètres de séparation utilisés sont connus de l'homme de métier et ne semblent pas non plus impliquer une activité inventive.

Par conséquent, l'homme du métier cherchant à résoudre le problème technique serait amené à combiner les techniques de séparation en chromatographie classique connues dans le domaine de la purification de particules virales avec celles utilisant une étape d'adsorption "en lit fluidisé" (dont les avantages sont connues dans le domaine de la purification des macromolécules) pour l'élaboration d'un procédé de purification alternative d'une préparation virale.

Aussi, l'objet des revendications 1-11 ne semble pas impliquer d'activité inventive au sens de l'Article 33(3) PCT.



REVENDEICATIONS

1. Procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit lit fluidisé renferme des particules d'adsorbant et est obtenu par la mise en suspension dans un fluide desdites particules sous l'action d'une ou plusieurs forces sélectionnées parmi les forces mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle et électrique.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2, comprenant :
 - a) une phase d'expansion desdites particules d'adsorbant dans une colonne de chromatographie, notamment par application d'un courant de tampon ascendant, ladite phase d'expansion étant maintenue jusqu'à l'obtention d'un lit fluidisé,
 - 15 b) une phase de dépôt de ladite préparation virale brute, notamment dans la partie inférieure de ladite colonne,
 - c) une phase de lavage par passage d'un tampon, notamment selon un courant ascendant,
 - d) une phase de sédimentation, éventuellement assistée par un flux de
20 tampon descendant,
 - e) une étape d'élution par application d'un flux de tampon, notamment descendant, afin de permettre le relargage des particules virales adsorbées sur lesdites particules d'adsorbant.
- 25 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées de polymère et, plus particulièrement, d'un polymère choisi parmi l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés.
5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce



que lesdites particules d'adsorbant portent au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand, ledit anti-ligand consistant en tout ou partie d'une dite particule virale d'intérêt

- 5 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en un groupement chargé positivement, avantageusement un groupement basique et, plus particulièrement, un groupement sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), $-R-CH(OH)-CH_2-N^+(CH_3)_3$ (groupement Q), guanidinium ou imine tels que la polyéthylèneimine (PEI).
- 10 7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées d'une matrice d'agarose et comprennent un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à ladite matrice d'agarose sur lesquelles est lié ledit groupement chargé positivement et, en particulier, le
- 15 groupement Q.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 25 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 30 et environ 40 mS/cm et, de préférence, entre environ 30 et environ 35
- 20 mS/cm.
9. Protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :
 - (i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :
 - 25 (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;
 - (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;



(c) collecte des cellules et/ou du surnageant,

(ii) purification de ladite préparation virale brute selon l'un des procédés des revendications 1 à 8.

5 10. Protocole selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :

(i) une étape de cassage ou de lyse des cellules après l'étape (c) suivie, de manière optionnelle, d'une étape de dégradation des acides nucléiques,

(ii) une étape d'inactivation des virus à enveloppe, et/ou

10 (iii) une étape de chromatographie en lit paqué et, en particulier, une étape de chromatographie en gel filtration..

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 ou protocole selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que lesdites particules virales sont des particules adénovirales.

PCT

REQUETE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) 340624/18032

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE D'OBTENTION D'UNE PREPARATION VIRALE PURIFIEE

Cadre n° II DEPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

TRANSGENE S.A.
11 Rue de Molsheim
67000 STRASBOURG
FRANCE

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'Etat) : FR

Domicile (nom de l'Etat) : FR

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☒ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DEPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

KOEHL Michel
5 Quai Saint-Thomas
67000 STRASBOURG
FRANCE

Cette personne est :

☐ déposant seulement

☒ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FR

Domicile (nom de l'Etat) : FR

Cette personne est déposant pour :

☐ tous les Etats désignés

☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique

☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement

☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRESENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒ mandataire

☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

MARTIN Jean-Jacques, SCHRIMPF Robert, AHNER Francis,
WARCOIN Jacques, TEXIER Christian, LE FORESTIER Eric
CABINET REGIMBEAU
26 Avenue kléber
75116 PARIS - FRANCE

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance: cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Suite du cadre n° III AUTRES DEPOSANTS OU (AUTRES) INVENTEURS

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

GAILLAC David
11 Résidence Plein-Sud
83 Avenue de Versailles
94320 THIAIS
FRANCE

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☒ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) : FR

Domicile (nom de l'Etat) : FR

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☒ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
☐ déposant et inventeur
☐ inventeur seulement
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est déposant pour :

- ☐ tous les Etats désignés ☐ tous les Etats désignés sauf les Etats-Unis d'Amérique ☐ les Etats-Unis d'Amérique seulement ☐ les Etats indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées: une au moins doit l'être):

Brevet régional

- ☐ AP Brevet ARIPO : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ République-Unie de Tanzanie, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☐ EA Brevet eurasiatique : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasiatique et du PCT
- ☒ EP Brevet européen : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☐ OA Brevet OAPI : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée)

Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée):

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> AE Émirats arabes unis | <input type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input type="checkbox"/> AL Albanie | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Arménie | <input type="checkbox"/> LT Lituanie |
| <input type="checkbox"/> AT Autriche | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australie | <input type="checkbox"/> LV Lettonie |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaïdjan | <input type="checkbox"/> MA Maroc |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnie-Herzégovine | <input type="checkbox"/> MD République de Moldova |
| <input type="checkbox"/> BB Barbade | <input type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarie | <input type="checkbox"/> MK Ex-République yougoslave de Macédoine |
| <input type="checkbox"/> BR Brésil | |
| <input type="checkbox"/> BY Bélarus | <input type="checkbox"/> MN Mongolie |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> CH et LI Suisse et Liechtenstein | <input type="checkbox"/> MX Mexique |
| <input type="checkbox"/> CN Chine | <input type="checkbox"/> NO Norvège |
| <input type="checkbox"/> CR Costa Rica | <input type="checkbox"/> NZ Nouvelle-Zélande |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input type="checkbox"/> PL Pologne |
| <input type="checkbox"/> CZ République tchèque | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> DE Allemagne | <input type="checkbox"/> RO Roumanie |
| <input type="checkbox"/> DK Danemark | <input type="checkbox"/> RU Fédération de Russie |
| <input type="checkbox"/> DM Dominique | <input type="checkbox"/> SD Soudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estonie | <input type="checkbox"/> SE Suède |
| <input type="checkbox"/> ES Espagne | <input type="checkbox"/> SG Singapour |
| <input type="checkbox"/> FI Finlande | <input type="checkbox"/> SI Slovénie |
| <input type="checkbox"/> GB Royaume-Uni | <input type="checkbox"/> SK Slovaquie |
| <input type="checkbox"/> GD Grenade | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Géorgie | <input type="checkbox"/> TJ Tadjikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkménistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambie | <input type="checkbox"/> TR Turquie |
| <input type="checkbox"/> HR Croatie | <input type="checkbox"/> TT Trinité-et-Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Hongrie | <input type="checkbox"/> TZ République-Unie de Tanzanie |
| <input type="checkbox"/> ID Indonésie | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> IL Israël | <input type="checkbox"/> UG Ouganda |
| <input type="checkbox"/> IN Inde | <input checked="" type="checkbox"/> US États-Unis d'Amérique |
| <input type="checkbox"/> IS Islande | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japon | <input type="checkbox"/> UZ Ouzbékistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input type="checkbox"/> KG Kirghizistan | <input type="checkbox"/> YU Yougoslavie |
| <input type="checkbox"/> KP République populaire démocratique de Corée | <input type="checkbox"/> ZA Afrique du Sud |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR République de Corée | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Sainte-Lucie | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille :

- ☐
☐

Déclaration concernant les désignations de précaution : outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (La confirmation (y compris les taxes) doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

| Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITE | | <input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire. | | |
|--|---------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année) | Numéro de la demande antérieure | Lorsque la demande antérieure est une : | | |
| | | demande nationale : pays | demande régionale : * office régional | demande internationale : office récepteur |
| (1) 22/02/99 | 99 02167 | FRANCE | | |
| (2) | | | | |
| (3) | | | | |

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : **VI**

* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.

| | | | |
|--|--|--|--|
| Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE | | | |
| Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : ISA / EP | | Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional) 5 NOVEMBRE 1999 FA 574011 OEB | |

| | |
|--|--|
| Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DEPOT | |
| La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant : requête : 4 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 30 revendications : 2 abrégé : 1 dessins : partie de la description réservée au listage des séquences : Nombre total de feuilles : 37 | Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé à suivre (2) 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input checked="" type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : Copie du Rapport de Recherche |
| Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé : | Langue de dépôt de la demande internationale : Français |

| | |
|---|---|
| Cadre n° IX SIGNATURE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE | |
| A côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe. | |
| WARCOIN Jacques | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> CABINET REGIMBEAU CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE 28, Avenue Kléber 75116 PARIS FRANCE </div> |

| | |
|--|---|
| Réservé à l'office récepteur | |
| 1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale : 3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale : 4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT : | 2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus : <input type="checkbox"/> non reçus : |
| 5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA / | 6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche. |

| | |
|--|--|
| Réservé au Bureau international | |
| Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international : | |

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

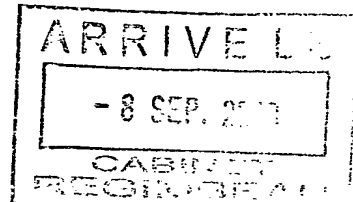
PCT

AVIS INFORMANT LE DEPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE AUX OFFICES DESIGNES

(règle 47.1.c), première phrase, du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:
MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE



| | | |
|---|---|--|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 31 août 2000 (31.08.00) | | |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340624/18032 | | AVIS IMPORTANT |
| Demande internationale no PCT/FR00/00430 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 février 2000 (21.02.00) | |
| Déposant TRANSGENE S.A. etc | | Date de priorité (jour/mois/année) 22 février 1999 (22.02.99) |

1. Il est notifié par la présente qu'à la date indiquée ci-dessus comme date d'expédition de cet avis, le Bureau international a communiqué, comme le prévoit l'article 20, la demande internationale aux offices désignés suivants:
AU,US

Conformément à la règle 47.1.c), troisième phrase, ces offices acceptent le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien eu lieu à la date d'expédition indiquée plus haut, et le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

2. Les offices désignés suivants ont renoncé à l'exigence selon laquelle cette communication doit être effectuée à cette date:
CA,EP,JP

La communication sera effectuée seulement sur demande de ces offices. De plus, le déposant n'est pas tenu de remettre de copie de la demande internationale aux offices en question (règle 49.1)a-bis)).

3. Le présent avis est accompagné d'une copie de la demande internationale publiée par le Bureau international le 31 août 2000 (31.08.00) sous le numéro WO 00/50573

RAPPEL CONCERNANT LE CHAPITRE II (article 31.2)a) et règle 54.2)

Si le déposant souhaite reporter l'ouverture de la phase nationale jusqu'à 30 mois (ou plus pour ce qui concerne certains offices) à compter de la date de priorité, la **demande d'examen préliminaire international** doit être présentée à l'administration compétente chargée de l'examen préliminaire international avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité.

Il appartient exclusivement au déposant de veiller au respect du délai de 19 mois.

Il est à noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

RAPPEL CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE (article 22 ou 39.1))

Si le déposant souhaite que la demande internationale procède en phase nationale, il doit, dans le délai de 20 mois ou de 30 mois, ou plus pour ce qui concerne certains offices, accomplir les actes mentionnés dans ces dispositions auprès de chaque office désigné ou élu.

Pour d'autres informations importantes concernant les délais et les actes à accomplir pour l'ouverture de la phase nationale, voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 (Notification de la réception de l'exemplaire original) et le volume II du Guide du déposant du PCT.

| | |
|--|------------------------------------|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse | Fonctionnaire autorisé J. Zahra |
| no de télécopieur (41-22) 740.14.35 | no de téléphone (41-22) 338.83.38 |

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

[stamp]

| | | | |
|---|---|---|--|
| Date of mailing (day/month/year) 31 August 2000 (31.08.00) | | IMPORTANT NOTICE | |
| Applicant's or agent's file reference 340624/18032 | | | |
| International application No. PCT/FR00/00430 | International filing date (day/month/year) 21 February 2000 (21.02.00) | Priority date (day/month/year) 22 February 1999 (22.02.99) | |
| Applicant TRANSGENE S.A. etc | | | |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, each designated Office will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived their requirement whereby this communication must take place by that date:
CA,EP,JP

Communication will take place only when requested by these Offices. Moreover, the applicant is not required to furnish a copy of the international application to the Offices in question (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

31 August 2000 (31.08.00) under No. WO 00/50573

REMINDER REGARDING CHAPTER 11 (Article 31.2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

| | |
|---|--|
| <p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p> | <p>Authorized officer:</p> <p>J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22)338.83.38</p> |
|---|--|

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION RELATIVE
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITE

(instruction administrative 411 du PCT)

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE

| | |
|--|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 07 avril 2000 (07.04.00) | NOTIFICATION IMPORTANTE |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340624/18032 | |
| Demande internationale no PCT/FR00/00430 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 21 février 2000 (21.02.00) |
| Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée | Date de priorité (jour/mois/année) 22 février 1999 (22.02.99) |
| Déposant TRANSGENE S.A. etc | |

- La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
- Un astérisque(*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

| <u>Date de priorité</u> | <u>Demande de priorité n°</u> | <u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u> | <u>Date de réception du document de priorité</u> |
|-------------------------|-------------------------------|---|--|
| 22 févr 1999 (22.02.99) | 99/02167 | FR | 27 mars 2000 (27.03.00) |

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

R. Raissi

no de téléphone (41-22) 338.83.38

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

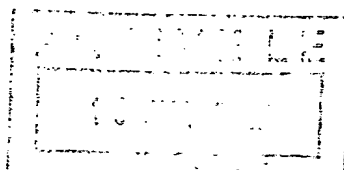
NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
26, avenue Kléber
F-75116 Paris
FRANCE



| | |
|---|---|
| Date d'expédition (jour/mois/année) 24 mars 2000 (24.03.00) | NOTIFICATION IMPORTANTE |
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340624/18032 | Demande internationale no PCT/FR00/00430 |

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

TRANSGENE S.A. (pour tous les Etats désignés sauf US)
KOEHL, Michel etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 21 février 2000 (21.02.00)
Date(s) de priorité revendiquée(s) : 22 février 1999 (22.02.99)
Date de réception de l'exemplaire original
par le Bureau international : 13 mars 2000 (13.03.00)
Liste des offices désignés :

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, CA, JP, US

ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- ☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
- ☒ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
- ☒ les exigences relatives aux documents de priorité.

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

| | |
|---|--|
| Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse n° de télécopieur (41-22) 740.14.35 | Fonctionnaire autorisé R. Raissi n° de téléphone (41-22) 338.83.38 |
|---|--|

**RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LES DELAIS DANS LESQUELS DOIT ETRE ABORDEE
LA PHASE NATIONALE**

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la notification de la réception de l'exemplaire original (formulaire PCT/IB/301) en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, telles qu'elles sont prescrites par les législations nationales.

Le délai d'accomplissement de ces actes de procédure est de **20 MOIS** à compter de la date de priorité ou, pour les Etats désignés qui ont été élus par le déposant dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure, de **30 MOIS** à compter de la date de priorité, à condition que cette élection ait été effectuée avant l'expiration du 19^e mois à compter de la date de priorité. Certains offices désignés (ou élus) ont fixé des délais qui expirent au-delà de 20 ou 30 mois à compter de la date de priorité. D'autres offices accordent une prolongation des délais ou un délai de grâce, dans certains cas moyennant le paiement d'une taxe supplémentaire.

En plus de ces actes de procédure, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. Il appartient au déposant de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices désignés n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Des informations détaillées concernant les actes de procédure à accomplir pour aborder la phase nationale auprès de chaque office désigné, les délais applicables et la possibilité d'obtenir une prolongation des délais ou un délai de grâce et toutes autres conditions applicables figurent dans le volume II du Guide du déposant du PCT. Les exigences concernant le dépôt d'une demande d'examen préliminaire international sont exposées dans le chapitre IX du volume I du Guide du déposant du PCT.

GR et ES sont devenues liées par le chapitre II du PCT le 7 septembre 1996 et le 6 septembre 1997, respectivement, et peuvent donc être élues dans une demande d'examen préliminaire international ou dans une élection ultérieure présentée le 7 septembre 1996 (ou à une date postérieure) ou le 6 septembre 1997 (ou à une date postérieure), respectivement, quelle que soit la date de dépôt de la demande internationale (voir le second paragraphe, ci-dessus).

Veuillez noter que seul un déposant qui est ressortissant d'un Etat contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international.

CONFIRMATION DES DESIGNATIONS FAITES PAR MESURE DE PRECAUTION

Seules les désignations expresses faites dans la requête conformément à la règle 4.9.a) figurent dans la présente notification. Il est important de vérifier si ces désignations ont été faites correctement. Des erreurs dans les désignations peuvent être corrigées lorsque des désignations ont été faites par mesure de précaution en vertu de la règle 4.9.b). Toute désignation ainsi faite peut être confirmée conformément aux dispositions de la règle 4.9.c) avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité. En l'absence de confirmation, une désignation faite par mesure de précaution sera considérée comme retirée par le déposant. Il ne sera adressé aucun rappel ni invitation. Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration précisant l'Etat désigné concerné (avec l'indication de la forme de protection ou de traitement souhaitée) et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.

EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITE

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international, ou si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout Etat désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

MARTIN, Jean-Jacques
Cabinet Regimbeau
20, Rue de Chazelles
75847 Paris CEDEX 17
FRANCE

[stamp]

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing (day/month/year)
22.05.2001

Applicant's or agent's file reference
340624/18032

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/FR00/00430

International filing date (day/month/year)
21/02/2000

Priority date (day/month/year)
22/02/1999

Applicant

TRANSGENE S.A. et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the International preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Nam and mailing address of the IPEA/



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. + 49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d
Fax: + 49 89 2399 - 4465

Authorized officer:

CLEERE, C

Tel. +49 89 2399-8061



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|--|
| Applicant's or Agent's file reference 340624/18032 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/FR00/00430 | International filing date (day/month/year) 21/02/2000 | Priority date (day/month/year) 22/02/1999 |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N7/02 | | |
| Applicant TRANSGENE S.A. et al. | | |

| | |
|----|---|
| 1. | This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. |
| 2. | This REPORT consists of a total of 6 sheets including this title page. <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Instruction 607 of Administrative Instructions of the PCT). These annexes consist of a total of 3 sheets. |
| 3. | This report contains indications relating to the following items: <ul style="list-style-type: none"> I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement according to Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application |

| | |
|--|--|
| Date of submission of the demand 11/09/2000 | Date of completion of this report 22.05.2001 |
| Name and mailing address of the IPEA/ <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0, Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div> | Authorized officer: Vix, O Telephone No. +49 89 2399 7326 <div style="text-align: right;"> </div> |

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/00430

I. Basis of the report

1. This report has been drawn up on the basis of the following elements *(the replacement sheets received by the receiving office in response to an invitation according to Article 14 are considered in the present report as "originally filed" and are not annexed to the report as they contain no amendments (Rules 70.16 and 70.17).):*

Description, pages:

1-30 as originally filed

Claims, No.:

1-11 received with the fax of 07/07/2000

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/fig

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/00430

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).

6. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|--------------------------|------|--------|------|
| Novelty | Yes: | Claims | 1-11 |
| | No: | Claims | |
| Inventive Step | Yes: | Claims | 1-11 |
| | No: | Claims | |
| Industrial Applicability | Yes: | Claims | 1-11 |
| | No: | Claims | |

2. Citations and explanations

see separate sheet

With regard to point I

Basis of the opinion

The amendments submitted with the letter dated July 07, 2000 do not seem to go beyond the explanation of the invention which appears in the application as filed (Article 34(2)(b) PCT).

The new set of claims 1-11 is considered to be admissible and will be used for the remainder of the examination.

With regard to point V

Reason statement pursuant to Article 35(2) regarding novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such declaration

1. Reference is made to the following documents:
D1: WO 96 27677 A (CANJI INC) September 12, 1996 (09-12-1996)
D2: WO 97 08298 A (GENZYME CORP; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) March 6, 1997 (03-06-1997)
D3: WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC; FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) February 20, 1997 (02-20-1997)
D4: US-A-5 522 993 (GUSTAFSSON JAN-GUNNER ET AL) June 4, 1996 (06-04-1996) cited in the application
D5: HARUNA I ET AL; 'SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE' VIROLOGY, Vol. 13, January 1, 1961 (01-01-1961), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822

Document cited by the examiner (a copy is attached in the annex):

D6: Hjorth R.: "Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing: recent developments" Trends Biotechnol. 1997, June, 15(6): 230-5

2. Novelty (Art. 33(2) PCT)

The purification process making use of a fluidized-bed adsorption step (also known as "Expanded-Bed Adsorption" or "EBA") is known in the field of protein or oligonucleotide purification. However, no document of the prior art cited in the research report mentions the use of this particular technique for purifying a viral particle. Claims 1-11 are considered to be novel within the meaning of Article 33(2) PCT.

3. Inventive step (Art. 33(3) PCT)

Document D2 describes the purification of adenoviruses or AAVs (with a view to use in gene therapy) using conventional chromatography methods (use of suitable conventional resins - in "batch" or "flow-through" - with the aim of avoiding damage to the viral particle, see D2 pages 4-6). The difference between the present application and D2 lies in the use of a novel chromatography step, namely a method using a "fluidized-bed" adsorption step.

The technical problem consists in finding an alternative method for purifying a viral preparation which can be used in the field of gene therapy.

The particular technique of fluidized-bed adsorption chromatography is known (cf. D4) and it is used in the field of protein purification, as also reported in document D6.

Viral preparations are generally purified using "conventional" chromatography steps (cf. examples in documents D1-D3 and D5).

However, it is known in the field of the art that the purification of biological material must be carried out as rapidly as possible in order to prevent any degradation and thus optimize the chances of conserving the integrity of the biological material to be separated. In parallel, cellular debris derived from lysing the cell lines producing the viral particles are also known for their capacity to clog conventional chromatography columns. The use of "fluidized-bed" chromatography for purifying viral vectors is mentioned in D1. Furthermore, D6 clearly mentions the advantages of this fluidized-bed adsorption chromatography technique for clarifying cell homogenates, the great rapidity of product purification and also the use of equipment similar to conventional chromatography. For example, groups known with regard to ion-exchange techniques in conventional chromatography are used in fluidized-bed adsorption chromatography. Similarly, affinity chromatography which is known to be effective for purifying the viral particles by conventional chromatography (cited in D2, page 6) exists in fluidized-bed form (purification of antibodies mentioned in D6).

Apart from being bigger on an atomic scale, these viral particles consist of a complex assembly of viral proteins which protect the genetic material of the virus and are governed by the same physicochemical rules as simpler molecules (such as recombinant proteins or oligonucleotides purified by "EBA" in the prior art).

Those skilled in the art would, consequently, be led to use this information in order to combine the advantages of the two techniques and thus achieve an "affinity" or "conventional" fluidized-bed adsorption chromatography step for purifying viral preparations. In the absence of unexpected

effects, the conditions and parameters of separation used are known to those skilled in the art and, equally, do not appear to involve an inventive step.

Consequently, those skilled in the art seeking to solve the technical problem would be led to combine the techniques for conventional chromatography separation which are known in the field of viral particle purification, with those using a "fluidized-bed" adsorption step (the advantages of which are known in the field of macromolecule purification) in order to elaborate an alternative method for purifying a viral preparation.

Thus, the subject matter of claims 1-11 does not appear to involve an inventive step within the meaning of Article 33(3) PCT.

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Référence du dossier du déposant ou du mandataire 340624/18032 | POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER | |
| Demande internationale n° PCT/FR 00/00430 | Date du dépôt international (jour/mois/année) 21/02/2000 | (Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/02/1999 |
| Déposant TRANSGENE S.A. et al. | | |

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la langue, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☐ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le titre,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'abrégé,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure des dessins à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☐ Aucune des figures n'est à publier.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PC 00/00430

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/02 B01D15/08 B01J8/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N B01D B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| X | WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 septembre 1996 (1996-09-12) le document en entier | 1-10 |
| X | WO 97 08298 A (GENZYME CORP ; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 mars 1997 (1997-03-06) le document en entier | 1-10 |
| X | WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 février 1997 (1997-02-20) le document en entier | 1-10 |
| X | US 5 522 993 A (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 juin 1996 (1996-06-04) cité dans la demande le document en entier | 1-10 |

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *A* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | DE 41 28 953 A (BASF AG) 4 mars 1993 (1993-03-04) | 1-10 |
| A | HARUNA I ET AL: "SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE" VIROLOGY, vol. 13, 1 janvier 1961 (1961-01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822 | 1-10 |
| A | EP 0 328 256 A (OWENS CORNING FIBERGLASS CORP) 16 août 1989 (1989-08-16) abrégé * exemples * | 1-10 |
| A | WO 89 08500 A (ROBINSON ERIC) 21 septembre 1989 (1989-09-21) le document en entier | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP 00/00430

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|--|--|
| WO 9627677 | A | 12-09-1996 | US 5837520 A AU 5421396 A CA 2214837 A EP 0813606 A | 17-11-1998 23-09-1996 12-09-1996 29-12-1997 |
| WO 9708298 | A | 06-03-1997 | AU 7010896 A CA 2230655 A EP 0847442 A JP 11511326 T | 19-03-1997 06-03-1997 17-06-1998 05-10-1999 |
| WO 9706243 | A | 20-02-1997 | FR 2737730 A AU 712490 B AU 6496496 A BR 9609837 A CA 2226312 A CN 1199419 A EP 0848752 A NZ 313213 A US 6008036 A | 14-02-1997 11-11-1999 05-03-1997 09-03-1999 20-02-1997 18-11-1998 24-06-1998 29-03-1999 28-12-1999 |
| US 5522993 | A | 04-06-1996 | EP 0538467 A EP 0922489 A JP 2807691 B JP 6500050 T WO 9218237 A | 28-04-1993 16-06-1999 08-10-1998 06-01-1994 29-10-1992 |
| DE 4128953 | A | 04-03-1993 | WO 9305144 A MX 9204984 A | 18-03-1993 01-04-1993 |
| EP 0328256 | A | 16-08-1989 | JP 2006750 A | 10-01-1990 |
| WO 8908500 | A | 21-09-1989 | NONE | |



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

| | | |
|---|-----------|--|
| (51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12N 7/02, B01D 15/08, B01J 8/18 | A1 | (11) Numéro de publication internationale: WO 00/50573 (43) Date de publication internationale: 31 août 2000 (31.08.00) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00430 (22) Date de dépôt international: 21 février 2000 (21.02.00) (30) Données relatives à la priorité: 99/02167 22 février 1999 (22.02.99) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KOEHL, Michel [FR/FR]; 5, quai Saint-Thomas, F-67000 Strasbourg (FR). GAILLAC, David [FR/FR]; 11, Résidence Plein-Sud, 83, avenue de Versailles, F-94320 Thiais (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). | | (81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avec revendications modifiées.</i> |
| (54) Title: METHOD FOR OBTAINING A PURIFIED VIRAL PREPARATION (54) Titre: PROCEDE D'OBTENTION D'UNE PREPARATION VIRALE PURIFIEE (57) Abstract <p>The invention concerns a method for purifying a crude viral preparation containing viral, in particular adenoviral, particles of interest. The invention is characterised in that it comprises a step of adsorption on a fluidised bed. The invention also concerns a protocol for producing viral particles for use in gene therapy comprising such a purifying process.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne un procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, notamment adénovirales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé. Elle a également pour objet un protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant un tel procédé de purification.</p> | | |

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

| | | | | | | | |
|----|---------------------------|----|-----------------------|----|--------------------------|----|-----------------------|
| AL | Albanie | ES | Espagne | LS | Lesotho | SI | Slovénie |
| AM | Arménie | FI | Finlande | LT | Lituanie | SK | Slovaquie |
| AT | Autriche | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Sénégal |
| AU | Australie | GA | Gabon | LV | Lettonie | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaïdjan | GB | Royaume-Uni | MC | Monaco | TD | Tchad |
| BA | Bosnie-Herzégovine | GE | Géorgie | MD | République de Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbade | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tadjikistan |
| BE | Belgique | GN | Guinée | MK | Ex-République yougoslave | TM | Turkménistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Grèce | | de Macédoine | TR | Turquie |
| BG | Bulgarie | HU | Hongrie | ML | Mali | TT | Trinité-et-Tobago |
| BJ | Bénin | IE | Irlande | MN | Mongolie | UA | Ukraine |
| BR | Brésil | IL | Israël | MR | Mauritanie | UG | Ouganda |
| BY | Bélarus | IS | Islande | MW | Malawi | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada | IT | Italie | MX | Mexique | UZ | Ouzbékistan |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon | NE | Niger | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NL | Pays-Bas | YU | Yougoslavie |
| CH | Suisse | KG | Kirghizistan | NO | Norvège | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | République populaire | NZ | Nouvelle-Zélande | | |
| CM | Cameroun | | démocratique de Corée | PL | Pologne | | |
| CN | Chine | KR | République de Corée | PT | Portugal | | |
| CU | Cuba | KZ | Kazakstan | RO | Roumanie | | |
| CZ | République tchèque | LC | Sainte-Lucie | RU | Fédération de Russie | | |
| DE | Allemagne | LI | Liechtenstein | SD | Soudan | | |
| DK | Danemark | LK | Sri Lanka | SE | Suède | | |
| EE | Estonie | LR | Libéria | SG | Singapour | | |

PROCEDE D'OBTENTION D'UNE PREPARATION VIRALE PURIFIEE

La présente invention a pour objet un nouveau procédé de purification d'une préparation virale. L'invention présente un intérêt tout particulier dans la perspective d'applications dans le domaine de la thérapie génique, appliquée notamment à l'homme.

La thérapie génique se définit comme le transfert d'information génétique présentant un intérêt thérapeutique ou vaccinal dans une cellule ou un organisme hôte en vue d'obtenir dans cette cellule ou cet organisme un effet thérapeutique ou vaccinal. Le premier protocole appliqué à l'homme a été initié aux Etats Unis en septembre 1990 sur un patient présentant une immunodéficience liée à une mutation du gène codant pour l'Adénine Désaminase (ADA). Dans ce cadre particulier, il s'agissait de remplacer le gène défectueux, dont le dysfonctionnement était à l'origine de la maladie génétique, par un gène fonctionnel. Le succès relatif de cette première expérimentation a encouragé le développement de cette technologie dont l'application a depuis été étendue au traitement d'autres maladies aussi bien génétiques qu'acquises (cancers, maladies infectieuses telles que par exemple le SIDA).

La mise en oeuvre des protocoles de thérapie génique repose principalement sur l'utilisation de vecteurs qui permettent le transfert et, éventuellement, l'expression de l'information génétique d'intérêt ou gène dans une cellule ou un organisme hôte. De nombreux vecteurs d'origine virale et non-virale ont été développés au cours des dernières années et ont fait l'objet de nombreuses publications accessibles à l'homme du métier (par exemple voir Robbins et al., 1998, Tibtech, 16, 35-40 et Rolland, 1998, Therapeutic Drug Carrier Systems, 15, 143-198).

L'intérêt des virus utilisés à titre de vecteurs de thérapie génique a

déjà été évoqué dans l'art antérieur. Parmi les virus les plus couramment utilisés, les adénovirus constituent des vecteurs de choix car ils peuvent être utilisés dans le cas de nombreux types cellulaires, qu'il s'agisse de cellules en division ou quiescentes, ils sont non intégratifs et peu pathogènes. Ainsi
5 que le décrivent les demandes de brevets n° WO 94/28152 ou WO 94/12649, ils trouvent de nombreuses applications dans le domaine de la thérapie génique. Toutefois, les propriétés de nombreux autres virus ont également été exploitées pour la mise au point de vecteurs viraux de thérapie génique. A titre d'exemple, on peut citer les vecteurs poxviraux, et plus particulièrement
10 les vecteurs dérivés du virus de la vaccine ou du Virus Modifié d'Ankara (MVA ; EP 324350), les vecteurs rétroviraux (Naldini et al., 1996, Science, 272, 263-267), etc...

Les virus, et notamment les adénovirus, actuellement utilisés dans les protocoles de thérapie génique sont des virus dont le génome a été modifié
15 (par délétion, mutation,...) de manière à affecter leur propriété répliquative dans le but d'éviter leur propagation dans l'environnement ou l'organisme hôte, à réduire leur propriété immunogène et à permettre l'introduction de séquences nucléiques hétérologues d'intérêt. Plus particulièrement, comme le décrit notamment la demande de brevet WO 94/28152, le génome de ces virus peut
20 être spécifiquement délété de régions essentielles à l'obtention de particules virales infectieuses. De même, les demandes de brevet EP83286, EP110385, US5185146, WO9702355 décrivent l'identification de formes virales naturellement atténuées qui peuvent être exploitées pour l'élaboration de vecteurs viraux. Un virus dans le génome duquel est introduit au moins un
25 gène d'intérêt est appelé «virus recombiné» et par extension «vecteur recombiné» ; plus particulièrement de tels virus recombinés comprennent également les éléments appropriés pour l'expression de ces gènes dans les cellules ou organismes hôtes.

Les virus présentent la caractéristique de se multiplier essentiellement de manière intra-cellulaire. Par ailleurs, dans le cadre de la mise en oeuvre de protocoles de thérapie génique, il est nécessaire de disposer de particules virales, notamment infectieuses, qui renferment un vecteur d'intérêt, notamment recombiné, associé à des polypeptides spécifiques et qui sont utilisables comme produit pour la thérapie génique. Des procédés pour la production de particules virales utilisables dans le cadre de protocoles de thérapie génique sont connus qui comprennent les étapes suivantes:

- 10 (i) obtention d'une préparation virale brute ,
- (ii) purification de ladite préparation virale brute.

La préparation virale brute est obtenue selon les étapes suivantes :

- (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné ;
- 15 (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;
- (c) collecte des cellules ;
- (d) étape facultative de traitement des cellules, notamment selon un protocole de lyse cellulaire, de façon à libérer les particules virales intracellulaires produites, en particulier lorsque les particules virales produites ne sont pas libérées dans le milieu pendant l'étape de culture ;
- 20 (e) et éventuellement un traitement supplémentaire du mélange obtenu à l'étape (c) ou (d) par une DNase destiné à limiter la quantité d'ADN cellulaire et à réduire la viscosité du mélange.
- 25

Outre les particules virales produites dans les cellules, la préparation virale brute comprend aussi toute sorte de constituants, débris cellulaires,

toxines, etc...qu'il est nécessaire d'éliminer par la mise en oeuvre d'une ou plusieurs étapes de purification permettant d'obtenir une préparation renfermant des particules virales purifiées utilisables en thérapie génique.

5 Selon les procédés connus de l'art antérieur, la purification de la préparation virale brute est réalisée soit par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium (Huyghe, B et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403-1416), soit par adsorption en lit paqué (Huyghe, B et al., 1995, Human Gene Therapy, 6, 1403-1416).

10 L'ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium présente de nombreux inconvénients. En effet, le chlorure de césium est un composé toxique incompatible avec un usage thérapeutique chez l'homme qu'il convient d'éliminer par une étape supplémentaire de purification. Par ailleurs, cette technique d'ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium est surtout adaptée au traitement de volumes réduits de préparation virale brute.

15 En effet, les dispositifs d'ultracentrifugation permettent seulement le traitement de l'ordre de 600 ml de préparation virale brute. Si de tels volumes sont bien adaptés à des productions destinées aux travaux de recherche, ils ne permettent pas de répondre de manière satisfaisante aux contraintes d'une production industrielle. En outre, la technique d'ultracentrifugation n'est pas automatisable. Enfin, le temps nécessaire à la mise en oeuvre de cette

20 technique de purification par ultracentrifugation, environ 40 heures, est également un élément très limitant dans des perspectives de productions industrielles. Chacun de ces inconvénients indique que cette technique de purification d'une préparation virale brute est incompatible avec les exigences

25 de rendement et de coût requises par les industriels.

La méthode de purification par adsorption en lit paqué repose sur l'utilisation de particules d'adsorbant sédimentées ou compactées les unes aux autres, disposées dans une colonne de chromatographie. Selon ce

procédé de purification, la préparation virale brute à purifier est déposée sur la colonne et les particules virales sont purifiées par éluions différentielles successives. Toutefois, étant donné la composition complexe de la préparation virale brute, comprenant notamment des débris cellulaires, la colonne de chromatographie se colmate fréquemment rendant la purification laborieuse et inefficace. Afin d'éviter ce colmatage, il est possible de procéder, avant le dépôt de la préparation sur la colonne de chromatographie, à une étape de clarification de ladite préparation virale brute afin d'éliminer les débris cellulaires. Il est également proposé de réaliser des étapes de concentration, d'ajustement du pH ou de la conductivité de la préparation virale brute avant son passage sur la colonne. Ces étapes supplémentaires et indispensables entraînent une baisse du rendement global du procédé de purification qui ne permet pas d'obtenir des rendements de production compatibles avec une exploitation industrielle satisfaisante.

Dans ce contexte, il serait avantageux de pouvoir disposer d'une nouvelle méthode pour la préparation, à partir de cultures cellulaires, de particules virales suffisamment purifiées pour permettre leur utilisation en thérapie génique. Plus particulièrement, les procédés décrits jusque-là ne sont pas satisfaisants en ce qu'ils comprennent des étapes limitantes au niveau du volume de préparation virale brute à purifier (ultracentrifugation) et / ou par leur nombre trop important qui se traduit par une baisse du rendement global de l'ordre de 5 à 20% ne permettant pas de satisfaire une exploitation à l'échelle industrielle.

On a maintenant mis au point un nouveau procédé de purification d'une préparation virale brute parfaitement adapté à la production industrielle de particules virales destinées aux applications de thérapie génique.

La présente invention concerne en premier lieu un procédé de purification d'une préparation virale brute, renfermant des particules virales

d'intérêt, notamment adénovirales, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.

Le principe de l'adsorption en lit fluidisé est brièvement exposé ci-après. Des explications plus détaillées sont disponibles dans « Expanded Bed Adsorption , Principles and Methods » - Pharmacia Biotech - Edition AA ainsi
5 que dans le brevet US 5,522,993 dont les contenus font partie de la présente description.

A l'inverse de l'adsorption en lit paqué pour laquelle des particules solides d'adsorbant sont sédimentées ou compactées les unes contre les autres, l'adsorption en lit fluidisé repose sur le principe selon lequel des
10 particules solides d'adsorbant comprises dans ledit lit fluidisé sont maintenues en suspension dans un fluide (gazeux ou liquide) générant ainsi entre elles des espaces libres. Cette suspension des particules d'adsorbant est obtenue par l'action d'une ou plusieurs forces (mécanique,
15 électromagnétique, magnétique, gravitationnelle, électrique...). La suspension des particules d'adsorbant dans un fluide liquide ou gazeux peut par exemple être obtenue par la combinaison d'un courant dudit fluide dirigé de manière opposée au champ gravitationnel auquel sont naturellement soumises les particules d'adsorbant. La direction et l'intensité des deux forces sont
20 aisément choisies par l'homme de l'art afin de maintenir les particules d'adsorbant en suspension. De même, il est possible d'utiliser des particules d'adsorbant qui présentent une composition particulière qui les rend sensibles à une force magnétique ou/et électrique et permet ainsi d'obtenir une suspension de particules d'adsorbant comme précédemment décrite. Enfin,
25 il est également possible de disposer de particules d'adsorbant qui présentent elles-mêmes une charge magnétique ou électrique suffisante pour permettre leur mise en suspension dans des conditions appropriées. L'homme du métier dispose des connaissances nécessaires à la réalisation de ces variantes de

l'invention.

L'expansion, ou mise en suspension, des particules d'adsorbant génère l'apparition d'espaces entre lesdites particules qui permettent le passage des cellules, débris cellulaires ou autres particules indésirables que l'on souhaite éliminer de la préparation virale brute.

Selon la présente invention, les particules d'adsorbant utilisées dans l'étape d'adsorption en lit fluidisé sont notamment sélectionnées parmi des particules constituées :

- de matériaux composites, organiques et/ou inorganiques, tels que par exemple la silice, la dextrane-silice ou la cellulose-titane-dioxyde (Gilcris et al., 1994, Separations for Biotechnology, 3 , pp. 184-190);

- de polymères tels que par exemple l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés (par exemple le poly(N-isopropyl acrylamide), voir CA2147115).

Selon un mode particulier de réalisation, les particules d'adsorbant comprennent en outre un noyau central. Un tel noyau central consiste notamment en un noyau de quartz ou de métal inerte (tel que du zirconium) (Hansson et al., 1994, Biotechnology, 12, 285-288 ; Hjorth et al., 1995, Bioseparation, 5, 217-223) ou en un noyau dont la composition permet auxdites particules d'adsorbant l'incorporant d'être maintenues en suspension dans le fluide par l'application d'un champ magnétique, électrique ou électromagnétique (voir par exemple "Continuous cell suspension processing using magnetically stabilized fluidized beds" Biotechnology and Bioengineering, vol. 37 pp110-120 (1991) by B.E. Terranova and M.A. Burns).

Selon un cas préféré de l'invention, les particules d'adsorbant portent, directement ou indirectement, au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand. Conformément à la présente invention, un dit anti-ligand consiste en tout ou partie d'une particule virale

d'intérêt que l'on souhaite purifier à partir d'une préparation virale brute.

Par "ligand", on entend désigner :

- tout ou partie d'un polypeptide, capable de se lier de manière spécifique et réversible à tout ou partie d'une protéine de ladite particule virale d'intérêt, notamment une protéine de la capside ou de l'enveloppe, une protéine située à la surface de la particule adénovirale telle que l'hexon, les pentons (Hong et al, 1995, EMBO J., 14, 4714-4727), ou la fibre (Henry et al, 1994, J.Virol., 68, 5239-5246) etc... Il peut s'agir notamment de tout ou partie d'un anticorps, d'un récepteur membranaire spécifique, d'un peptide recombinant ou encore de la protéine A.
- tout ou partie d'une molécule autre qu'un polypeptide capable de lier de manière réversible ladite particule virale d'intérêt ou l'un de ses constituants (l'une des protéines citée ci-dessus). A titre d'exemples, on peut citer les héparines et les ligands d'affinité utilisés en IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography).
- un groupement chargé positivement, notamment un groupement basique, portant par exemple une amine substituée, notamment par des groupes alkyles ; de manière préférée, on choisira un groupement chargé basique sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), le groupement $-R-CH(OH)-CH_2-N^+-(CH_3)_3$ (également appelé groupement Q ; voir les résines Streamline® - Pharmacia), le groupement guanidinium ou encore les groupements imine tels que la polyéthylèneimine (PEI) ;
- un groupement chargé négativement, tel que par exemple un groupement sulfate de formule $R-SO_4^-$ avec par exemple R = groupes alkyles (par exemple méthyl sulfate) ou un groupement carboxylate de formule $R-COO^-$ avec par exemple R = groupes alkyles (par exemple méthyl carboxylate) ou encore un groupement phosphate de formule $R-PO_4^-$ avec par

exemple R = groupes alkyles.

De tels ligands chargés positivement ou négativement sont capables de se lier de manière spécifique à des anti-ligands de charge opposée.

Dans le cadre de la présente invention, les particules d'adsorbant préférées sont constituées d'une matrice d'agarose et comprennent un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à la matrice d'agarose sur lesquelles sont liées les groupements chargés positivement. D'une manière tout à fait préférée, les particules d'adsorbant sont les résines Streamline® de type XL commercialisées par Pharmacia et, tout particulièrement, la résine Streamline® Q XL constituée d'une matrice d'agarose (6 %) et comprenant un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à la matrice d'agarose sur lesquelles sont liées des groupements Q.

L'invention concerne également le cas pour lequel ledit ligand est indirectement fixé sur la particule d'adsorbant. Dans ce cas, ledit ligand est fixé par l'intermédiaire d'un bras chimique qui n'interfère pas dans la réactivité dudit ligand à l'égard de l'anti-ligand. De tels bras ainsi que leur utilisation sont largement décrits dans la littérature relative aux synthèses chimiques.

Il est également possible de choisir le pH auquel le procédé de l'invention sera réalisé de manière à optimiser la liaison spécifique ligand/anti-ligand, notamment dans le cas où l'on utilise des particules d'adsorbant portant un ligand chargé. Ainsi, dans le cas où l'on choisira d'utiliser des particules d'adsorbant porteuses de groupements basiques, notamment pour la purification de particules adénovirales dont les protéines de surface ont en majorité des points isoélectriques (pI) compris entre 5.3 et 6.0, le pH sera compris entre environ 6 et environ 10, avantageusement entre environ 7.5 et environ 9.5 et, de façon préférée sera d'environ 8.5, de manière à ce que l'essentiel des protéines virales soit chargé négativement et

interagisse avec les groupements basiques des particules d'adsorbant. Inversement, lorsque le procédé selon l'invention utilise des particules d'adsorbant portant des groupements chargés négativement, le pH choisi sera compris entre environ 3.0 et environ 5.0. Par ailleurs, il est également possible de travailler à des pH inférieurs au pI des protéines virales, notamment lorsque l'on utilise des particules d'adsorbant portant un ligand chargé négativement. Dans ce cas particulier, il est nécessaire d'utiliser un tampon de conductivité élevée afin de stabiliser les particules virales. L'homme du métier est en mesure d'ajuster le pH par l'utilisation de solutions tamponnées ou par l'ajout de bases ou d'acides pour respectivement augmenter ou réduire le pH selon les besoins.

Pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention, il est nécessaire que le ligand soit capable de se lier de manière réversible à l'anti-ligand d'intérêt. L'homme du métier est en mesure d'établir les conditions optimales en fonction du ligand, de l'anti-ligand et des particules d'adsorbant utilisées. A titre indicatif, un tampon équilibré à une concentration finale en NaCl de 400 mM est particulièrement adapté à la mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention utilisant la résine Streamline® Q XL pour la purification d'adénovirus recombinés. La dissociation ligand/anti-ligand peut être réalisée par tout moyen approprié et notamment en modifiant la salinité ou le pH du milieu réactionnel. De manière préférée, la dissociation est réalisée en augmentant la salinité.

En outre, selon l'invention, il est possible de suivre le procédé de purification, notamment en continu, sur les échantillons récoltés et traités selon le procédé de l'invention par tout moyen connu de l'homme de l'art. Il est notamment possible d'effectuer des mesures spectrophotométriques de l'absorbance à 260 nm et 280 nm et de calculer le ratio DO260/DO280 dans chaque échantillon sachant que toute préparation virale purifiée possède un

ratio DO 260 / DO 280 caractéristique. A titre indicatif, le ratio DO260/DO280 d'un préparation adénovirale purifiée est d'environ 1,25 (1,22 à 1,28). Il est également possible de suivre le procédé de purification par la mise en oeuvre de techniques de détection usuelles telles que par exemple des techniques d'électrophorèse, de PCR, d'immunofluorescence et de détermination du titre viral.

La température à laquelle est mis en oeuvre le procédé selon l'invention est préférentiellement comprise entre -5 et +50°C. Cependant, afin de préserver les propriétés infectieuses des particules virales que l'on souhaite purifier, on préférera une température comprise entre environ +4°C et +37°C et, plus particulièrement, entre environ +15°C et +25°C.

Selon un mode de réalisation préféré, le procédé selon l'invention est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 25 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 30 et environ 40 mS/cm et, de préférence, entre environ 30 et environ 35 mS/cm. Cependant, il est à la portée de l'homme de l'art de faire varier la conductivité selon la nature des contaminants et la composition du milieu de culture des particules virales. Avantageusement, les particules virales d'intérêt et les particules d'adsorbant sont équilibrées aux mêmes conditions de conductivité.

Lorsque le lit fluidisé est formé, c'est à dire que les particules d'adsorbant sont en suspension, il est possible que celles-ci soient animées d'un mouvement circulaire permanent connu sous le nom de « rouleaux de recirculation ». Ce phénomène diminue la capacité d'adsorption des particules et doit par conséquent être limité au maximum. Une solution possible consiste à utiliser des particules d'adsorbant de tailles hétérogènes. En effet, la distribution hétérogène des tailles permet aux particules d'adsorbant de plus petit volume de se localiser dans la partie supérieure du dispositif, par exemple une colonne, qui les renferme. Au contraire, les particules les plus

grosses sont localisées dans la partie inférieure dudit dispositif ce qui permet de réduire de manière importante la mobilité des particules.

Par conséquent, de manière préférentielle, les particules d'adsorbant selon l'invention seront choisies de façon à se qu'elles présentent des tailles
5 hétérogènes.

Une autre solution permettant d'éviter la formation de rouleaux de recirculation consiste à compartimenter le dispositif afin de limiter les possibilités de mouvement des particules d'adsorbant (A. Buijs and J.A. Wesselingh, 1980, Journal of Chromatography, vol.201 pp 319-327).

10 Comme évoqué ci-dessus, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, les particules d'adsorbant sont maintenues en suspension dans un dispositif. De manière avantageuse, ledit dispositif est de forme cylindrique et de manière préférée il s'agit d'une colonne de chromatographie. Dans un mode de réalisation préféré du procédé selon l'invention, on choisira une
15 colonne de chromatographie telle que décrite dans le brevet US 5, 522, 993. Cette colonne présente à chacune de ses extrémités au moins une entrée ou une sortie par lesquelles circulent les solutions d'effluent et d'éluant entrant et sortant de la colonne. Selon ce cas particulier, les particules d'adsorbant sont dans un premier temps soumises à une phase d'expansion, notamment
20 par application dans la colonne de chromatographie d'un courant de tampon ascendant obtenu en introduisant le tampon par l'entrée localisée à l'extrémité inférieure de la colonne et en l'évacuant par la sortie située à l'extrémité supérieure. Cette phase d'expansion est maintenue jusqu'à l'obtention d'un
« lit fluidisé », c'est à dire d'un équilibre entre la force de la gravité terrestre
25 qui attire les particules d'adsorbant vers l'extrémité inférieure de la colonne, et les forces d'entraînement du courant ascendant du tampon qui sont dirigées vers l'extrémité supérieure de la colonne.

Conformément à la présente invention, la préparation virale brute est

soumise à un procédé de purification comprenant une étape au moins d'adsorption en lit fluidisé. Plus particulièrement lorsque le dispositif est une colonne, après obtention du «lit fluidisé», la préparation virale brute à purifier est déposée sur la colonne. Dans le cas préféré de l'invention pour lequel

5 ladite colonne est telle que décrite dans le brevet US 5, 522, 993, la préparation virale brute est introduite dans la partie inférieure de cette colonne. Ensuite, la préparation virale brute est lavée par passage de tampon. Dans le cas préféré, le passage de tampon est effectué selon un courant ascendant. Après la phase de lavage, le flux de tampon est stoppé

10 afin de permettre aux particules d'adsorbant de sédimenter. Selon un cas préféré, cette phase de sédimentation est assistée par un flux de tampon descendant. Une étape d'élution est alors conduite par application d'un flux de tampon, notamment descendant, dans des conditions de concentration, de pH et/ou de conductivité que l'homme du métier est en mesure d'adapter

15 afin de permettre le relargage des particules virales adsorbées sur les particules adsorbantes. De même, il est à la portée de l'homme de l'art d'adapter les conditions de chromatographie en fonction de différents paramètres, notamment du volume de la colonne, des particules d'adsorbant choisies, de la hauteur des particules d'adsorbant dans ladite colonne

20 (généralement de 10 à 50 cm, avantageusement de 10 à 40 cm et, de préférence aux environs de 30 cm), du débit (de 50 à 600 cm/h, avantageusement de 100 à 400 cm/h et, de préférence aux environs de 300 cm/h particulièrement pour une colonne de résine Streamline® Q XL d'une hauteur d'environ 30 cm), de la concentration virale, de la charge et/ou de la

25 nature des contaminants. L'élution de la préparation virale peut par exemple être réalisée en modifiant la salinité ou le pH de l'éluant.

Le procédé selon l'invention peut en outre comprendre des étapes supplémentaires précédant ou suivant la chromatographie en lit fluidisé.

Selon un mode de réalisation optionnel, les fractions virales éluées obtenues après l'étape de chromatographie en lit fluidisé peuvent être rassemblées et éventuellement concentrées selon les techniques de l'art. On peut citer notamment l'ultrafiltration tangentielle et la diafiltration. Les cassettes BioMax
5 PES (Millipore référence PXB300C50) et PLCMK (Millipore référence PXC300C50) conviennent tout particulièrement. Cette étape de concentration est tout particulièrement indiquée lorsqu'on envisage de parfaire la pureté de la préparation de particules virales par une étape supplémentaire de chromatographie autre que le lit fluidisé. Cette étape de concentration permet
10 de placer les particules virales dans un milieu adapté à la mise en œuvre de cette deuxième chromatographie.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de purification de la préparation virale brute selon l'invention peut en outre comprendre une étape de chromatographie en lit paqué, et de manière préférée, une étape de
15 chromatographie en gel filtration. Les deux étapes (étape d'adsorption en lit fluidisé et chromatographie en lit paqué) peuvent être réalisées dans un ordre quelconque, toutefois de manière préférée, on procédera en premier lieu à l'étape d'adsorption en lit fluidisé et en second lieu à la chromatographie en lit paqué, notamment à une chromatographie de gel filtration.

20 Selon l'étape de chromatographie de gel filtration, l'échantillon est traité sur un support solide comprenant des billes de diamètre compris entre 3 et 160 μm , avantageusement entre 5 et 105 μm et de préférence entre 10 et 80 μm . De préférence, ce support a une porosité proche de la taille du virus afin que celui-ci ne pénètre pas dans les billes. Au contraire, les molécules
25 de taille inférieure pénètrent dans les billes et leur migration est retardée. Différents types de supports peuvent être utilisés tels que les matrices à base d'agarose (Sépharose), de dextrane (gel Séphadex), d'acrylamide (gels Séphacryl et Trisacryl), la silice (gels TSK et SW), de copolymères éthylène

glycol méthacrylate (gels Biosec, Toyopearl HW, TSK et PW) et de mélanges, notamment d'agarose et de dextran (gel Superdex). Les supports mentionnés sont de préférence utilisés sans groupement de fonctionnalisation. Les supports de chromatographie de gel filtration particulièrement appropriés à la mise en œuvre du procédé de préparation selon l'invention sont les suivants :

- matrices allyl dextran-méthylène bis acrylamide (Séphacryl S300 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm , Séphacryl S400 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm , Séphacryl S500 HR de diamètre de bille compris entre 25 et 75 μm et Séphacryl S1000 SF de diamètre de bille compris entre 40 et 105 μm ; Pharmacia),

- matrices d'éthylène glycol-méthacrylate (Toyopearl HW 55, Toyopearl HW 65 et Toyopearl HW 75 de diamètre de billes variant de 20 à 60 μm ; Tosohaas),

- matrices de N acryl amine hydroxyl propanédiol (Trisacryl d'un diamètre de billes compris entre 80 et 160 μm ; Biosépra), ou

- matrice d'agarose (Macro-Prep SE de diamètre de bille compris entre 20 et 80 μm ; Biorad).

A titre indicatif, on notera qu'un support de type Toyopearl HW65F, S (porosité 1000 Å) ou Séphacryl S400HR est préféré. Une telle colonne est équilibrée dans un tampon présentant des conditions salines et un pH limitant les interactions hydrophobes entre le support et les particules virales. Avantagusement, on utilisera un tampon Tris-HCl 25mM, MgCl_2 2mM, saccharose 2% à pH 8,5 ou un tampon Tris-HCl 10mM, aspartate de sodium 10mM, Tween 80 54 mg/l et saccharose 2% à pH 8,5. Les particules virales d'intérêt sont éluées sans être retenues et sortent de la colonne avant les contaminants de poids moléculaire ou de taille inférieurs. Selon un mode de réalisation optionnel, les fractions virales obtenues après l'étape de

purification peuvent être rassemblées et éventuellement concentrées selon les techniques habituelles. On peut citer l'ultrafiltration tangentielle et la diafiltration. Les cassettes BioMax PES (Millipore référence PXB300C50) et PLCKMK (Millipore référence PXC300C52) conviennent tout particulièrement.

5 L'invention concerne également un protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :

(i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :

10 (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;

(b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la réplication virale et la production de particules virales;

15 (c) collecte des cellules et/ou du surnageant,

(ii) purification de ladite préparation virale brute selon un procédé caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé telle que décrite précédemment.

20 Selon un cas particulier préféré, après l'étape (c) de collecte des cellules, on procède à une étape de cassage ou de lyse des cellules, généralement après resuspension de la biomasse cellulaire collectée, afin de permettre la libération des particules virales produites de manière intracellulaire. Tous les moyens classiques peuvent être mis en œuvre, notamment les moyens chimiques et / ou mécaniques. On peut procéder par
25 exemple à des cycles de congélation-décongélation qui fragilisent les membranes cellulaires, à une lyse enzymatique (emploi d'enzymes dégradant les membranes cellulaires) ou chimique (emploi de détergent, choc de pH...). Les moyens mécaniques peuvent résulter d'ultrason (sonication), d'attrition

(billes de verre DynoMill, BeadMill), de forces de pression et de cisaillement (homogénéiseur haute pression French Press), de microfluides (Microfluidics, Newton, MA) ou encore de l'action mécanique de deux cylindres générant des forces de cisaillement hydrauliques et mécaniques (homogénéiseur
5 Silverson).

Toutefois, bien qu'elle ne soit pas exclue, cette étape de cassage/lyse des cellules n'est pas obligatoire dans le cas particulier où les particules virales sont libérées dans le milieu de culture. Dans ce cas, l'étape (ii) peut être directement appliquée à l'échantillon renfermant à la fois les cellules et
10 le milieu, ou exclusivement sur le surnageant de la culture qui renferme les particules virales à purifier.

Le protocole selon l'invention peut en outre comprendre une étape de clarification ayant pour but d'éliminer les insolubles (débris cellulaire, floculats de macromolécules ...etc) éventuellement produits lors de l'étape de cassage
15 ou de lyse des cellules. Elle peut être réalisée par toute technique conventionnelle de filtration (filtration en profondeur, microfiltration tangentielle...) ou centrifugation (en continue...). De nombreux filtres peuvent être utilisés à la condition qu'ils aient une porosité permettant de laisser passer les particules virales d'intérêt et de retenir les insolubles. On indique
20 que les particules adénovirales ont une taille d'environ 0,07 à 0,1 μm qui nécessitent l'utilisation de filtres de porosité supérieure. Par ailleurs, les filtres peuvent être en matière synthétique (nylon), organique (cellulose) ou non organique (zirconium). Selon un mode de réalisation avantageux, on procède à des filtrations successives sur des filtres de porosité décroissante, par
25 exemple en premier lieu sur un filtre de porosité 8 μm (Sartorius 5591301P5-00) puis sur un filtre de porosité 5 μm (Sartorius 5591342P5-00) puis sur un filtre de porosité 3-0,8 μm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621304E9-00-A) puis, éventuellement, sur un filtre de porosité comprise entre 0,8 et 0,65

µm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621305G9-00-A). Selon une autre variante, la filtration peut être réalisée par microfiltration tangentielle sur membranes planes ou fibres creuses de porosité supérieure à la taille de l'adénovirus. A cet égard, les membranes Durapore (Millipore) et Omega
5 (Pall) peuvent être employées.

En outre, le protocole pour la production de particules virales utilisables dans le cadre de protocoles de thérapie génique selon l'invention peut comprendre au moins une étape de dégradation des acides nucléiques présents en quantités importantes après le cassage des cellules. A cet effet,
10 les enzymes de restriction non spécifiques de type endo- ou exonucléases peuvent être employées. Selon un mode préféré, l'enzyme choisie est la benzonase, éventuellement en présence de β cyclodextrine qui facilite la précipitation des lipides (concentrations finales recommandées de 5 à 50 U/ml de benzonase et de 0,1 à 10 % et, en particulier, 1,5 % de β
15 cyclodextrine).

Le protocole de l'invention peut également comprendre une étape facultative d'inactivation des virus à enveloppe. Cette étape permet, notamment dans le cas des préparations adénovirales d'améliorer la sécurité du produit final et d'augmenter la qualité de la préparation adénovirale
20 purifiée. Un exemple d'étape d'inactivation de virus à enveloppe est donné dans la demande de brevet français No. 98/16147. Il est possible de procéder à l'étape d'inactivation et à l'étape de dégradation des acides nucléiques de manière concomitante.

Le protocole pour la production de particules virales selon l'invention
25 peut également comprendre une étape de filtration stérilisante, ladite étape de filtration stérilisante étant de préférence réalisée après l'étape (c) ou (ii) dudit procédé de préparation. On aura avantageusement recours à des filtres de 0,22 µm. On peut citer, par exemple, les unités de filtration de type

Minisart (Sartorius, référence SM16534), Sartolab P20 (Sartorius, référence 18053D), Millex GF (Millipore, référence SLGS025BS), Millex GV (Millipore, référence SLGV025BS), Millex GP (Millipore, référence SLGPR25LS) ou encore Spirale Cap (Version Super CQS 92 HS ou HP ; Gelman Sciences),
5 Criticap 50 (12995, Gelman Sciences) ou Millipak (Millipore ref. MPGL04SK2 ou MPGL02SH2) .

Le procédé de purification d'une préparation virale brute et le protocole pour la production de particules virales selon l'invention concernent notamment des préparations virales comprenant des particules virales
10 d'intérêt pour des applications en thérapie génique, et notamment pour la préparation de préparations vaccinales, telles que par exemple des particules adénovirales, poxvirales, iridovirales, papovavirales, rotavirales, parvovirales, hepadnavirales, herpétiques, réovirales, coronavirales, flavivirales, togavirales, mononegavirales, arenavirales, bunyavirales, orthomyxovirales,
15 calcivirales, picornavirales. De préférence, ces particules virales renferment un virus recombiné. Selon la présente invention, la préparation virale brute que l'on cherche à purifier peut contenir une ou plusieurs particules virales d'origines virales différentes.

La mise en oeuvre des procédés et protocoles de l'invention est tout
20 particulièrement adaptée à l'obtention de particules adénovirales purifiées comprenant des adénovirus recombinants défectifs pour la réplication. « Recombinant » fait référence à la présence d'au moins un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments appropriés à son expression dans une cellule hôte. «Défectif pour la réplication » signifie que les informations
25 génétiques disponibles ne permettent pas la réplication autonome du virus considéré dans une cellule hôte. Dans ce cas, la production de particules virales requiert l'infection ou la transfection par tout moyen approprié, de cellules adaptées, dite cellules de complémentation, avec le virus déficient

généralement recombiné. Ces cellules de complémentation fournissent *en trans* les informations nécessaires à la réplication et l'assemblage des virus déficients sous forme de particules virales. De telles lignées, ainsi que leur utilisation, sont largement décrites dans la littérature (voir par exemple les
5 demandes WO 94/28152 ou WO 97/00326 ; la lignée 293, Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59-72 ; Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032). D'autres virus pour leur part requièrent des conditions de culture cellulaire plus spécifiques mais parfaitement maîtrisées (voir par exemple VV, MVA, rétrovirus,...). Les cellules de complémentation infectées ou transfectées sont
10 mises en culture dans des conditions largement décrites, pendant un temps suffisant pour permettre aux virus de se répliquer, et aux particules virales de s'assembler.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après. Toutefois, l'invention ne
15 saurait se limiter au contenu desdits exemples.

EXEMPLES

Les adénovirus recombinants utilisés dans les exemples qui suivent, ont été construits par la technique de recombinaison homologue décrite dans Chartier et al. (1996, J. Virol. 70, 4805-4810). Les constructions mises en
20 oeuvre ont été réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ou une édition plus récente) ou selon les recommandations du fabricant lorsqu'on utilise un kit commercial. Les étapes de clonage utilisent la souche
25 E. coli 5K (hsdR, mcrA), DH5a [(recA1, endA1, hodR17 (r-m-), supE44 thi-1, gyrA (nalr)] ou NM522 (supE, thi, D(lac-proAB), Dhds5, (r-m-), (F' proAB, lacI^q, ZDM15) et celles de recombinaison homologue la souche E. coli BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557-580). S'agissant de la réparation

des sites de restriction, la technique employée consiste en un remplissage des extrémités 5' protubérantes à l'aide du grand fragment de l'ADN polymérase I d'E. coli (Klenow, Boehringer Mannheim). Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit de purification d'ADN GeneCleanII^R (Bio101Inc.).

- 5 Par ailleurs, les fragments de génome adénoviral employés dans les différentes constructions sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260.

En ce qui concerne la biologie cellulaire, les cellules sont transfectées
10 ou transduites et cultivées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On a recours aux lignées cellulaires 293 (ATCC CRL-1573), A549 E1+ (WO94/28152) et 293-E4ORF6+7 (Lusky et al., 1998, J. Virol. 72, 2022-2032). Il est entendu que d'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C en atmosphère
15 humide enrichie à 5% de CO₂ dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL) complémenté avec 1 mM de glutamine, 1% d'acides aminés (Gibco BRL), 40mg/l de gentamycine et 10% de sérum de veau foétal (SVF, Gibco BRL). Les cellules sont transfectées selon les techniques de l'art (précipitation au phosphate de calcium...)

- 20 Les exemples qui suivent ont été réalisés à l'aide d'adénovirus recombinants exprimant un gène marqueur ou un gène thérapeutique. Ils sont dérivés du sérotype Ad5 et ont la structure suivante:

- AdTG6297 est un vecteur adénoviral défectif pour les fonctions E1 (délétion des nt 459 à 3328) et E3 (délétion du fragment XbaI s'étendant des
25 nt 28592 à 30470) dans le génome duquel est inséré en remplacement de la région E1, une cassette d'expression du gène marqueur codant pour la protéine GFP (pour green fluorescent protein). Celle-ci réagit à l'excitation lumineuse (485 nm) par l'émission d'une lumière fluorescente dont on mesure

l'intensité au moyen d'un filtre (535 nm). Plus précisément, la cassette est composée du promoteur CMV suivi d'un intron chimère, de la séquence codant pour la protéine GFP et le polyA du virus SV40. Les séquences introniques sont isolées du plasmide pCI (Promega Corp, pCI mammalian expression vector E1731) et comprennent le site donneur d'épissage de l'intron 1 du gène b-globine humaine ainsi que le point de branchement et le site accepteur d'épissage du gène d'une immunoglobine de souris. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur AdTG6297 dans une lignée de complémentation de E1 (293 ou A549 E1+) et amplifiées par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1).

- Le vecteur AdTG5643 est un vecteur délété des régions E1 (nt 459 à 3328), E3 (nt 28592 à 30470) et E4 (nt 32994 à 34998) et exprimant le gène thérapeutique CFTR humain. La cassette d'expression est constituée du promoteur précoce CMV, de l'ADNc CFTR et du poly A du gène b-globine de lapin et est insérée à la place des séquences E1 délétées. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur AdTG5643 dans une lignée de complémentation de E1 et E4 (293-E4ORF6+7) et un stock viral constitué par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1 et E4).

- Le vecteur AdTG13383 est un vecteur délété des régions E1 (nt 459 à 3511), E3 (nt 28539 à 30470) et exprimant le gène thérapeutique IL2 humain. La cassette d'expression est constituée du promoteur précoce CMV, de l'intron synthétique isolé de pCI (décrit ci-dessus) de l'ADNc codant pour l'IL-2 humaine et du poly A SV40 et est insérée à la place des séquences E1 délétées. Les particules virales sont produites par transfection du vecteur pTG13383 dans une lignée de complémentation de E1. Un stock viral est constitué par passages successifs sur une lignée permissive (complémentant E1).

EXEMPLE 1 : Préparation de virus à partir des cellules de complémentation.

Les cellules A549-E1+ sont cultivées en boîtes de culture jusqu'à atteindre une concentration de 1×10^6 cellules/ml et sont ensuite infectées
5 avec un préstock d'AdTG6297 à raison d'une MOI d'environ 3. Les cellules infectées sont récoltées à 72 h post infection et centrifugées à basse vitesse. Le culot est repris dans environ 600 ml de milieu de culture sans sérum. La préparation ainsi obtenue correspond à un volume d'environ 20 l de culture.

Les particules virales intracellulaires sont libérées après cassage des
10 cellules soumises à l'action mécanique pendant 7 à 10 min d'un homogénéiseur Silverson (L4R- Silverson) réglé à une vitesse de rotation de 4200 tours/min.

A ce stade, la préparation est très visqueuse du fait de la libération de l'ADN génomique suite au cassage cellulaire. On ajoute à la préparation
15 virale un volume d'un tampon permettant une action optimale de la benzonase et constitué de Tris 100 mM, $MgCl_2$ 4 mM, saccharose 4% pH 8,5 auxquels a été ajouté l'agent de solubilisation Tween 80 (Merck référence 8-22187-1000) à une concentration de 2%. Le mélange est mis sous agitation à température ambiante avant d'ajouter la benzonase à raison de 50 U/ml
20 (Merck référence 101697) et on laisse la réaction se poursuivre pendant 1 à 2 h à température ambiante et sous agitation.

EXEMPLE 2 : Préparation de virus à partir de la culture cellulaire.

L'exemple 1 est reproduit à la différence que l'on récolte 72 h post
25 infection les cellules et le surnageant de culture (volume d'environ 20 l) et l'ensemble est directement soumis à l'étape de cassage pour obtenir la préparation virale brute à purifier.

EXEMPLE 3 : Purification de la préparation virale brute à l'aide d'une étape de chromatographie en lit fluidisé.

L'exemple 3 a pour but d'illustrer un mode de réalisation du procédé selon l'invention pour l'obtention de particules virales purifiées.

- 5 Dans un premier temps, l'une quelconque des préparations virales brutes obtenues aux exemples 1 et 2 est soumise à une étape d'inactivation des virus enveloppés. Cette étape d'inactivation est réalisée par action du TNBP/Tween 80 (Tributyl phosphate Réf. : 24 0494 Aldrich) à une concentration finale de 0,3 % et 1% respectivement. Pour ce faire, la
- 10 préparation virale brute obtenue à l'exemple 1 ou 2 est diluée volume à volume dans une solution tampon de Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, saccharose 2% NaCl 450 mM et TNBP 0,6 % (Aldrich 24-049-40), pH 8,5. Il est également possible d'ajouter à la préparation virale 1/10 de volume d'un tampon plus concentré Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, saccharose 2%, NaCl 2 M et TNBP 3 %
- 15 (Aldrich 24-049-40), pH 8,5. Il faut remarquer que les conditions salines utilisée (NaCl 400mM final) correspondent aux conditions d'équilibration de la chromatographie. L'action du TNBP / Tween 80 se poursuit sous agitation (500 rpm) pendant 3 heures à température ambiante ou pendant 4 heures à 4°C.
- 20 La préparation virale brute inactivée est ensuite soumise à une chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé. Pour ce faire, la préparation virale est chargée sur une colonne contenant une résine de type Streamline® QXL (Réf. Pharmacia 17-5075-01) préalablement équilibrée à l'aide d'un tampon Tris 50 mM, $MgCl_2$ 2mM, saccharose 2%, NaCl 400 mM, pH 8,5.
- 25 L'introduction du tampon se fait à la base de la colonne de chromatographie et sa sortie s'opère au sommet de la colonne, de manière à créer un courant de tampon ascendant dans la colonne. Un débit de 100 à 300 cm/h, et de préférence 150 cm/h est utilisé pour équilibrer et charger la colonne avec la

préparation virale brute à purifier. La préparation virale appliquée sur la colonne est alors rincée par différents passages de solution tampon dans le sens ascendant et descendant. Cette opération a pour but d'éliminer une première gamme de contaminants adsorbés par des interactions non ions-spécifiques ou mécaniquement coincés. Les différents constituants cellulaires adsorbés par des interactions ions-spécifiques sur le support de chromatographie sont ensuite élués progressivement par application d'un tampon d'équilibrage contenant des concentrations de sel croissantes (NaCl 425 mM, 450 mM, 500 mM). Un débit de 50 à 150 cm/heure et de préférence de 100 cm / heure est appliqué à partir du moment où le flux de tampon est descendant. L'éluat est recueilli en fractions. Chaque fraction est analysée par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm. Généralement, les protéines qui sont détectées uniquement à 280 nm, sont éluées par le tampon contenant une concentration en NaCl de 425 mM. Un second pic d'éluion est détecté à 280 et 260 nm. Il contient les particules adénovirales d'intérêt et est élué par le tampon de concentration saline 450 mM. Les fractions correspondant à ce second pic d'éluion sont rassemblées et éventuellement soumises à une chromatographie de gel filtration.

La colonne de chromatographie en lit fluidisé peut être régénérée, lavée et traitée par l'enchaînement d'étapes montré dans le tableau 1 :

Tableau 1

| Solution | Concentration | Volume de colonne (Vc) | Débit (cm/h) | Sens |
|----------------------------|---------------|------------------------|--------------|------------|
| NaCl | 1,5 M | 4 | 100 | Descendant |
| HCl | 0,05 N | 9 | 30 | Ascendant |
| H ₂ O | | 6 | 100 | Ascendant |
| NaOH | 1 N | 12 | 30 | Ascendant |
| NaCl | 3 M | 9 | 30 | Ascendant |
| Tris-HCl EDTA PH 8,0 | 10 mM 1 mM | 9 | 30 | Ascendant |

Le gel peut être ensuite stocké dans NaOH 0,01 M pendant plusieurs semaines.

- Le rendement d'un procédé d'obtention des particules virales peut être calculé de la manière suivante :

| Etapes | UI totales x 10 ¹³ | Rendement - % (global) | Rendement -% (étape) |
|--------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Départ | 2,69 | 100 | - |
| Benzonase | 2,74 | 102 | 102 |
| Inactivation | 2,58 | 96 | 94 |
| SQXL | 2,11 | 78 | 82 |

UI représente le nombre d'unités infectieuses

- Le procédé de l'invention permet de purifier un volume de l'ordre de 20 litres de préparation virale brute tout en obtenant un rendement global d'environ 80% après l'étape de chromatographie en lit fluidisé alors que les procédés de l'art antérieur permettent au mieux d'obtenir des rendements de l'ordre de 60 % après l'étape de chromatographie en lit paqué.

- EXEMPLE 4 : Préparation d'un lot clinique de particules adénovirales infectieuses à visée anti-cancéreuse (transfert du gène IL-2).

- Les cellules de complémentation E1 sont cultivées en bioréacteur en milieu Excell 525 (JRH Biosciences) jusqu'à l'obtention d'une concentration de 1×10^6 cellules/ml et sont ensuite infectées avec une aliquote d'un préstock d'AdTG13383 à une MOI d'environ 10. Les cellules infectées et le surnageant de culture (volume d'environ 20 l) sont récoltés à 72 h post infection. Les particules virales intracellulaires sont libérées après cassage des cellules soumises à l'action mécanique pendant 7 à 10 min d'un homogénéiseur Silverson (275 UHLS) réglé à une vitesse de rotation de 50 Hz (vitesse de

8.1).

La préparation virale brute ainsi obtenue est soumise une étape de clarification afin d'éliminer les insolubles (débris cellulaire, floculats de macromolécules ...etc). On procède à des filtrations successives sur des
5 filtres de porosité décroissante, tout d'abord sur un filtre de porosité 8 µm (Sartopure 300PP2 5592501) puis sur un filtre de porosité 5 µm (Sartopure 300 PP3 5592542) et enfin sur un filtre de porosité comprise entre 3 et 0,8µm (Sartorius, Sartoclean CA capsule 5621304E9-00-A).

La préparation virale clarifiée est soumise à une étape de dégradation
10 de l'ADN (action de la benzonase) et, de manière concomitante, à une étape d'inactivation des virus enveloppés (action du mélange TNBP 0,3% /Tween 80 1%). Pour ce faire, on ajoute à la préparation virale clarifiée un volume d'un tampon Tris 100 mM, MgCl₂ 4 mM, saccharose 4%, pH 8,5 comprenant du Tween 80 (Merck référence 8-22187-1000) à une concentration de 2%. Le
15 mélange est mis sous agitation à température ambiante avant d'ajouter la benzonase à raison de 10 U/ml (Merck référence 101697) et le TNBP (Aldrich 24-049-40) à une concentration finale de 0,3%. On laisse la réaction se poursuivre pendant 2 h à température ambiante et sous agitation (500 tr/min).

La préparation virale ainsi obtenue est diluée dans un volume de Tris
20 50 mM, MgCl₂ 2 mM, saccharose 2%, NaCl 2M de manière à obtenir une conductivité de 35 mS/cm optimale à la mise en oeuvre de la chromatographie d'échange d'ions en lit fluidisé.

La préparation virale ajustée en conductivité est chargée sur une
colonne contenant une résine de type Streamline® Q XL (Réf. Pharmacia 17-
25 5075-01) préalablement équilibrée à l'aide d'un tampon Tris 50 mM, MgCl₂ 2mM, saccharose 2%, NaCl 360 mM, pH 8,5. L'introduction du tampon se fait à la base de la colonne de chromatographie et sa sortie s'opère au sommet de la colonne, de manière à créer un courant de tampon ascendant dans la

colonne. Un débit de 300 cm/h est appliqué lors des de l'équilibrage et de la charge de la colonne avec la préparation virale. Une fois la charge effectuée, la colonne est alors rincée par différents passages de solution tampon dans le sens ascendant et descendant dans le but d'éliminer les contaminants adsorbés par des interactions non ions-spécifiques ou mécaniquement bloqués. Les différents constituants cellulaires adsorbés par des interactions ions-spécifiques sur le support de chromatographie sont ensuite élués progressivement par application d'un tampon d'équilibrage contenant des concentrations de sel croissantes (NaCl 650 mM, 2 M). Un débit de 150 cm / heure est appliqué à partir du moment où le flux de tampon est descendant. Les fractions éluées sont analysées par mesure de l'adsorbance à 260 et 280 nm. Les particules virales adsorbent aux deux longueurs d'onde avec un ratio DO 260 / DO 280 d'environ 1,25 (1,22 à 1,28) et généralement, le pic d'élution se situe à une zone de concentration saline de 650 mM.

La colonne de chromatographie en lit fluidisé peut être régénérée et lavée selon le protocole indiqué précédemment.

Les fractions obtenues après la chromatographie en lit fluidisé et contenant les particules adénovirales sont concentrées par diafiltration sur Labscale (Millipore) en utilisant les cassettes BioMax PES (Millipore référence PXB01MC50) ou des membranes de cellulose ayant un seuil de coupure de 300kDa et 1000 kDa.

La préparation virale concentrée est ensuite soumise à une chromatographie de gel filtration. Pour ce faire, la préparation virale est chargée sur une colonne contenant une résine de type Toyopearl HW65F (Réf. Tosohaas 07465) préalablement équilibrée à l'aide d'un tampon Tween 80 54 mg/l, Saccharose 2%, Tris 10 mM, Aspartate de Na 10 mM, pH 8,5. L'introduction du tampon se fait par le haut de la colonne de chromatographie et sa sortie s'opère par le bas. Un débit de 30 cm/h est utilisé pour équilibrer

et charger la colonne avec la préparation virale concentrée. La préparation virale appliquée sur la colonne (environ 20% du volume de colonne) est alors rincée par le tampon qui a permis d'équilibrer la colonne (Tween80 54 mg/l, Saccharose 2%, Tris 10 mM, Asp Na 10 mM, pH 8,5) dans le sens descendant. Cette opération a pour but d'éliminer les contaminants de petits poids moléculaire ralentis par le passage dans les pores du gel, contrairement au virus qui est exclu des billes de gel. Les différents constituants cellulaires ralentis sur le support de chromatographie sont ensuite élués progressivement toujours par même tampon. L'éluat est recueilli en fractions. Chaque fraction est analysée par mesure de l'adsorbance à 260 et 280 nm. Généralement, le premier pic détecté à 280 et 260 nm, contient les particules adénovirales d'intérêt alors que les contaminants protéiques détectés uniquement à 280 nm, sont élués en deuxième position. Les fractions correspondant au premier pic sont rassemblées, éventuellement concentrées par diafiltration, placées dans un tampon de formulation approprié (par exemple en solution saline ou isotonique) puis filtrées sur 0.22µm Sartolab P20 (Sartorius, référence 18053D) et conservées jusqu'à utilisation.

Le rendement d'un procédé d'obtention des particules virales peut être calculé de la manière suivante :

| Etapes | Rendement UI - % (global) | Rendement UI - % (étape) | Rendement PT - % (global) | Rendement PT -% (étape) |
|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Départ | 100 | - | 100 | - |
| Clarification | 96 | 96 | 78 | 78 |
| Dnase / Inactivation | 130 | 135 | 112 | 144 |
| SQXL | 107 | 82 | 88 | 78 |
| Concentration / Diafiltration | 107 | 100 | 86 | 98 |
| Gel filtration | 86 | 80 | 77 | 90 |

UI représente le nombre d'unités infectieuses déterminé par une

mesure quantitative de l'immunofluorescence avec un anticorps anti-DBP tel que décrit dans Lusky et al. (1998, J. Virol 72, 2022-2032) PT représente le nombre de particules virales totales déterminé par la mesure de l'adsorbance à 260 et 280 nm.

5

Le procédé de l'invention permet de purifier un volume de l'ordre de 20 litres de préparation virale brute tout en obtenant un rendement global d'environ 90% après l'étape de chromatographie en lit fluidisé alors que les procédés de l'art antérieur permettent au mieux d'obtenir des rendements de l'ordre de 60 % après l'étape de chromatographie en lit paqué. Et un
10 rendement global de 77 à 86% après l'étape de gel filtration.

REVENDICATIONS

1. Procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit lit fluidisé renferme des particules d'adsorbant et est obtenu par la mise en suspension dans un fluide desdites particules sous l'action d'une ou plusieurs forces sélectionnées parmi les forces mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle et électrique.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées de polymère et, plus particulièrement, d'un polymère choisi parmi l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés.
- 15 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant portent au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand, ledit anti-ligand consistant en tout ou partie d'une dite particule virale d'intérêt
- 20 5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en un groupement chargé positivement, avantageusement un groupement basique et, plus particulièrement, un groupement sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), $-R-CH(OH)-CH_2-N^+(CH_3)_3$ (groupement Q), guanidinium ou imine tels que la polyéthylèneimine (PEI).
- 25 6. Procédé selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées d'une matrice d'agarose et comprennent un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à ladite matrice d'agarose sur lesquelles est lié ledit groupement chargé positivement et, en particulier, le

groupement Q.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 25 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 30 et environ 40 mS/cm et, de préférence, entre environ 30 et environ 35 mS/cm.
8. Protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :
- (i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :
- (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;
- (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;
- (c) collecte des cellules et/ou du surnageant,
- (ii) purification de ladite préparation virale brute selon l'un des procédés des revendications 1 à 7.
9. Protocole selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend en outre :
- (i) une étape de cassage ou de lyse des cellules après l'étape (c) suivie, de manière optionnelle, d'une étape de dégradation des acides nucléiques,
- (ii) une étape d'inactivation des virus à enveloppe, et/ou
- (iii) une étape de chromatographie en lit paqué et, en particulier, une étape de chromatographie en gel filtration..
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7 ou protocole selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que lesdites particules virales sont des particules adénovirales.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau International le 25 Juillet 2000 (25.07.00);
revendication 3 ajoutée; autre revendications inchangées (3 pages)]

1. Procédé de purification d'une préparation virale brute renfermant des particules virales d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comporte au moins une étape d'adsorption en lit fluidisé.
- 5 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit lit fluidisé renferme des particules d'adsorbant et est obtenu par la mise en suspension dans un fluide desdites particules sous l'action d'une ou plusieurs forces sélectionnées parmi les forces mécanique, électromagnétique, magnétique, gravitationnelle et électrique.
- 10 3. Procédé selon la revendication 2, comprenant :
 - a) une phase d'expansion desdites particules d'adsorbant dans une colonne de chromatographie, notamment par application d'un courant de tampon ascendant, ladite phase d'expansion étant maintenue jusqu'à l'obtention d'un lit fluidisé,
 - 15 b) une phase de dépôt de ladite préparation virale brute, notamment dans la partie inférieure de ladite colonne,
 - c) une phase de lavage par passage d'un tampon, notamment selon un courant ascendant,
 - d) une phase de sédimentation, éventuellement assistée par un flux de
20 tampon descendant,
 - e) une étape d'élution par application d'un flux de tampon, notamment descendant, afin de permettre le relargage des particules virales adsorbées sur lesdites particules d'adsorbant.
- 25 4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées de polymère et, plus particulièrement, d'un polymère choisi parmi l'agarose, le polyacrylamide, le polystyrène ou leurs dérivés.
5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce

que lesdites particules d'adsorbant portent au moins un ligand capable de se lier de manière spécifique et réversible à un anti-ligand, ledit anti-ligand consistant en tout ou partie d'une dite particule virale d'intérêt

- 5 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit ligand consiste en un groupement chargé positivement, avantageusement un groupement basique et, plus particulièrement, un groupement sélectionné parmi les groupements diméthylaminoéthyl (DMAE), diéthylaminoéthyl (DEAE), triméthylaminoéthyl (TMAE), $-R-CH(OH)-CH_2-N^+-(CH_3)_3$ (groupement Q), guanidinium ou imine tels que la polyéthylèneimine (PEI).
- 10 7. Procédé selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que lesdites particules d'adsorbant sont constituées d'une matrice d'agarose et comprennent un noyau central de quartz et des chaînes de dextrane couplées de manière covalente à ladite matrice d'agarose sur lesquelles est lié ledit groupement chargé positivement et, en particulier, le
- 15 groupement Q.
8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il est réalisé dans des conditions de conductivité comprises entre environ 25 et environ 70 mS/cm, avantageusement entre environ 30 et environ 40 mS/cm et, de préférence, entre environ 30 et environ 35
- 20 mS/cm.
9. Protocole pour la production de particules virales utilisables pour la thérapie génique comprenant les étapes (i) et (ii) suivantes :
- (i) obtention d'une préparation virale brute comprenant les étapes :
- (a) infection ou transfection d'une lignée cellulaire appropriée par
- 25 au moins un vecteur viral d'intérêt, préférentiellement recombiné;
- (b) culture de ladite lignée cellulaire infectée ou transfectée dans des conditions permettant la replication virale et la production de particules virales ;

- (c) collecte des cellules et/ou du surnageant,
- (ii) purification de ladite préparation virale brute selon l'un des procédés des revendications 1 à 8.

10. Protocole selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il comprend en
- 5 outre :
- (i) une étape de cassage ou de lyse des cellules après l'étape (c) suivie, de manière optionnelle, d'une étape de dégradation des acides nucléiques,
 - (ii) une étape d'inactivation des virus à enveloppe, et/ou
 - (iii) une étape de chromatographie en lit paqué et, en particulier, une étape
- 10 de chromatographie en gel filtration..
11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 ou protocole selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que lesdites particules virales sont des particules adénovirales.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/FR 00/00430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N/02 B01D15/08 B01J8/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N B01D B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 September 1996 (1996-09-12) the whole document | 1-10 |
| X | WO 97 08298 A (GENZYME CORP ; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 March 1997 (1997-03-06) the whole document | 1-10 |
| X | WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ; FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 February 1997 (1997-02-20) the whole document | 1-10 |
| X | US 5 522 993 A (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 June 1996 (1996-06-04) cited in the application the whole document | 1-10 |

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May 2000

Date of mailing of the international search report

25/05/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.

PCT/FR 00/00430

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | DE 41 28 953 A (BASF AG) 4 March 1993 (1993-03-04) | 1-10 |
| A | HARUNA I ET AL: "SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE" VIROLOGY, vol. 13, 1 January 1961 (1961-01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822 | 1-10 |
| A | EP 0 328 256 A (OWENS CORNING FIBERGLASS CORP) 16 August 1989 (1989-08-16) abstract * exemples * | 1-10 |
| A | WO 89 08500 A (ROBINSON ERIC) 21 September 1989 (1989-09-21) the whole document | 1-10 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/00430

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|--|--|
| WO 9627677 A | 12-09-1996 | US 5837520 A AU 5421396 A CA 2214837 A EP 0813606 A | 17-11-1998 23-09-1996 12-09-1996 29-12-1997 |
| WO 9708298 A | 06-03-1997 | AU 7010896 A CA 2230655 A EP 0847442 A JP 11511326 T | 19-03-1997 06-03-1997 17-06-1998 05-10-1999 |
| WO 9706243 A | 20-02-1997 | FR 2737730 A AU 712490 B AU 6496496 A BR 9609837 A CA 2226312 A CN 1199419 A EP 0848752 A NZ 313213 A US 6008036 A | 14-02-1997 11-11-1999 05-03-1997 09-03-1999 20-02-1997 18-11-1998 24-06-1998 29-03-1999 28-12-1999 |
| US 5522993 A | 04-06-1996 | EP 0538467 A EP 0922489 A JP 2807691 B JP 6500050 T WO 9218237 A | 28-04-1993 16-06-1999 08-10-1998 06-01-1994 29-10-1992 |
| DE 4128953 A | 04-03-1993 | WO 9305144 A MX 9204984 A | 18-03-1993 01-04-1993 |
| EP 0328256 A | 16-08-1989 | JP 2006750 A | 10-01-1990 |
| WO 8908500 A | 21-09-1989 | NONE | |

RAPPORT DE RECHERCHER INTERNATIONALE

Demi : XXXXXXXXXX Internationale No
PCT/FR 00/00430

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N7/02 B01D15/08 B01J8/18

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N B01D B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| X | WO 96 27677 A (CANJI INC) 12 septembre 1996 (1996-09-12) le document en entier | 1-10 |
| X | WO 97 08298 A (GENZYME CORP ; RIORDAN CATHERINE E O (US); ERICKSON AMY E (US); SMI) 6 mars 1997 (1997-03-06) le document en entier | 1-10 |
| X | WO 97 06243 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS VACC ;FANGET BERNARD (FR); FRANCON ALAIN (F) 20 février 1997 (1997-02-20) le document en entier | 1-10 |
| X | US 5 522 993 A (GUSTAFSSON JAN-GUNNAR ET AL) 4 juin 1996 (1996-06-04) cité dans la demande le document en entier | 1-10 |
| | -/- | |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *I* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 mai 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Panzica, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Déma nationale No

PCT/FR 00/00430

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | DE 41 28 953 A (BASF AG) 4 mars 1993 (1993-03-04) | 1-10 |
| A | HARUNA I ET AL: "SEPARATION OF ADENOVIRUS BY CHROMATOGRAPHY ON DEAE-CELLULOSE" VIROLOGY, vol. 13, 1 janvier 1961 (1961-01-01), pages 264-267, XP000601693 ISSN: 0042-6822 | 1-10 |
| A | EP 0 328 256 A (OWENS CORNING FIBERGLASS CORP) 16 août 1989 (1989-08-16) abrégé * exemples * | 1-10 |
| A | WO 89 08500 A (ROBINSON ERIC) 21 septembre 1989 (1989-09-21) le document en entier | 1-10 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Déma Internationale No

PCT/FR 00/00430

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille d brevet(s) | | Date de publication |
|---|---|------------------------|--|---|------------------------|
| WO 9627677 | A | 12-09-1996 | US 5837520 | A | 17-11-1998 |
| | | | AU 5421396 | A | 23-09-1996 |
| | | | CA 2214837 | A | 12-09-1996 |
| | | | EP 0813606 | A | 29-12-1997 |
| WO 9708298 | A | 06-03-1997 | AU 7010896 | A | 19-03-1997 |
| | | | CA 2230655 | A | 06-03-1997 |
| | | | EP 0847442 | A | 17-06-1998 |
| | | | JP 11511326 | T | 05-10-1999 |
| WO 9706243 | A | 20-02-1997 | FR 2737730 | A | 14-02-1997 |
| | | | AU 712490 | B | 11-11-1999 |
| | | | AU 6496496 | A | 05-03-1997 |
| | | | BR 9609837 | A | 09-03-1999 |
| | | | CA 2226312 | A | 20-02-1997 |
| | | | CN 1199419 | A | 18-11-1998 |
| | | | EP 0848752 | A | 24-06-1998 |
| | | | NZ 313213 | A | 29-03-1999 |
| | | | US 6008036 | A | 28-12-1999 |
| US 5522993 | A | 04-06-1996 | EP 0538467 | A | 28-04-1993 |
| | | | EP 0922489 | A | 16-06-1999 |
| | | | JP 2807691 | B | 08-10-1998 |
| | | | JP 6500050 | T | 06-01-1994 |
| | | | WO 9218237 | A | 29-10-1992 |
| DE 4128953 | A | 04-03-1993 | WO 9305144 | A | 18-03-1993 |
| | | | MX 9204984 | A | 01-04-1993 |
| EP 0328256 | A | 16-08-1989 | JP 2006750 | A | 10-01-1990 |
| WO 8908500 | A | 21-09-1989 | AUCUN | | |

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

| | | |
|---|-----------|--|
| (51) International Patent Classification ⁷ : B01D 15/00, G01N 30/48 // B01J 20/00 | A1 | (11) International Publication Number: WO 00/57982 (43) International Publication Date: 5 October 2000 (05.10.00) |
| (21) International Application Number: PCT/DK00/00142 (22) International Filing Date: 24 March 2000 (24.03.00) (30) Priority Data: PA 1999 00415 26 March 1999 (26.03.99) DK (71) Applicant (for all designated States except US): UPFRONT CHROMATOGRAPHY A/S [DK/DK]; Lersø Parkallé 42, DK-2100 Copenhagen Ø (DK). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): OLANDER, Morten, Aae [DK/DK]; Røddinggade 3, 4.th., DK-1735 Copenhagen V (DK). LIHME, Allan, Otto, Fog [DK/DK]; Furesøbakken 13, DK-3460 Birkerød (DK). HOBLEY, Timothy, John [AU/DK]; Tyrolsgade 12, 2. th., DK-2300 Copenhagen S (DK). SIMON, Marcos [ES/DK]; Aalborggade 32, 2. tv., DK-2100 Copenhagen Ø (DK). THEODOSSIOU, Irini [GR/DK]; Ringstedgade 5, 4. th., DK-2100 Copenhagen Ø (DK). THOMAS, Owen, Robert, Tyrynys [GB/DK]; Ringstedgade 5, 4. th., DK-2100 Copenhagen Ø (DK). (74) Agent: PLOUGMANN, Vingtoft & PARTNERS A/S; Sankt Annæ Plads 11, P.O. Box 3007, DK-1021 Copenhagen K (DK). | | (81) Designated States: AE, AL, AM, AT, AT (Utility model), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, CZ (Utility model), DE, DE (Utility model), DK, DK (Utility model), DM, DZ, EE, EE (Utility model), ES, FI, FI (Utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KR (Utility model), KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (Utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i> <i>Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i> |
| (54) Title: FLUIDISED BED PURIFICATION OF BIO-MACROMOLECULES SUCH AS PLASMID DNA, CHROMOSOMAL DNA, RNA, VIRAL DNA, BACTERIA AND VIRUSES (57) Abstract <p>The present invention relates to particulate material having a density of at least 2.5 g/ml, where the particles of the particulate material have an average diameter of 5-75 µm, and the particles of the particulate material are essentially constructed of a polymeric base matrix, e.g. a polysaccharide such as agarose, and a non-porous core material, e.g. steel and titanium, said core material having a density of at least 3.0 g/ml, said polymeric base matrix including pendant groups which are positively charged at pH 4.0 or which are affinity ligands for a bio-molecule. Possible pendant groups include polyethyleneimine (PEI), diethylaminoethyl (DEAE) and quaternary aminoethyl (QAE). The materials are useful in expanded bed or fluidised bed chromatography processes, in particular for purification of bio-macromolecules such as plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA, viral DNA, bacteria and viruses.</p> | | |

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

| | | | | | | | |
|----|--------------------------|----|--|----|--|----|--------------------------|
| AL | Albania | ES | Spain | LS | Lesotho | SI | Slovenia |
| AM | Armenia | FI | Finland | LT | Lithuania | SK | Slovakia |
| AT | Austria | FR | France | LU | Luxembourg | SN | Senegal |
| AU | Australia | GA | Gabon | LV | Latvia | SZ | Swaziland |
| AZ | Azerbaijan | GB | United Kingdom | MC | Monaco | TD | Chad |
| BA | Bosnia and Herzegovina | GE | Georgia | MD | Republic of Moldova | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagascar | TJ | Tajikistan |
| BE | Belgium | GN | Guinea | MK | The former Yugoslav Republic of Macedonia | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Greece | ML | Mali | TR | Turkey |
| BG | Bulgaria | HU | Hungary | MN | Mongolia | TT | Trinidad and Tobago |
| BJ | Benin | IE | Ireland | MR | Mauritania | UA | Ukraine |
| BR | Brazil | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Iceland | MX | Mexico | US | United States of America |
| CA | Canada | IT | Italy | NE | Niger | UZ | Uzbekistan |
| CF | Central African Republic | JP | Japan | NL | Netherlands | VN | Viet Nam |
| CG | Congo | KE | Kenya | NO | Norway | YU | Yugoslavia |
| CH | Switzerland | KG | Kyrgyzstan | NZ | New Zealand | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Democratic People's Republic of Korea | PL | Poland | | |
| CM | Cameroon | KR | Republic of Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kazakhstan | RO | Romania | | |
| CU | Cuba | LC | Saint Lucia | RU | Russian Federation | | |
| CZ | Czech Republic | LJ | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Germany | LK | Sri Lanka | SE | Sweden | | |
| DK | Denmark | LR | Liberia | SG | Singapore | | |
| EE | Estonia | | | | | | |

FLUIDISED BED PURIFICATION OF BIO-MACROMOLECULES SUCH AS PLASMID DNA, CHROMOSOMAL DNA, RNA, VIRAL DNA, BACTERIA AND VIRUSES

FIELD OF THE INVENTION

- 5 A fluidised/expanded bed adsorption process for purification of bio-macromolecules is described. The method has been developed to be a first capture step in a downstream process in the production of bio-macromolecules such as nucleic acids, e.g. plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA and virus DNA, and viruses themselves, and even bacteria.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

- With the growing interest in gene therapy, the need to produce large quantities of gene therapy vectors becomes more pressing. Currently 24% of protocols under trial employ plasmid DNA as the delivery vehicle for gene therapy and vaccine applications. Viral DNA is also used as delivery vehicle in many gene therapy cases. Given the large size of gene
- 15 vector molecules and the shear sensitivity of the solids produced following cell lysis and neutralisation to extract the gene vectors from microbial cells or viral material, traditional unit operations such as centrifugation, filtration and packed bed chromatography are not especially attractive. Fluidised bed adsorption or expanded bed adsorption, techniques based on fluidisation, offer considerable promise with intractable biological feedstock
- 20 containing insoluble impurities.

- An expanded bed is characterised by low degree of back-mixing of the adsorbent media. This means that each adsorbent particle move within a limited volume of the total bed. An expanded bed is called a stabilised fluidised bed. The stability occur when the adsorbent
- 25 particles make up a so called classified bed where the larger and/or most dense adsorbent particles are positioned furthest down in the bed and the smaller and/or less dense adsorbent particles are positioned further up in the bed. The adsorbent media used in this invention is designed for use in a fluidised and preferable in an expanded bed. The size distribution and density variation determine the stability of the bed. As used herein,
- 30 the term "fluidised/expanded" bed refers to that the unit operation at least is a fluidised bed and preferable an expanded bed.

There are at present at least two commercial suppliers of adsorbents for expanded bed chromatography. Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden) market Streamline™ (which

utilises adsorbents of cross-linked polysaccharides (agaros) with quartz particles incorporated as high density fillers. The adsorbents have a density of about 1.2 g/ml with diameters being in the range of 125-315 μm . WO92/18237 (Pharmacia LKB

Biotechnology AB) describe beads for downstream processing comprising a polymer
5 matrix into which glass or silica particles have been incorporated, and their use in downstream processing, especially stabilised fluidised bed separations. The beads have a diameter of 100-1000 μm and a density of 1.10-1.50 g/ml of hydrated beads. The core materials are typically glass or silica.

10 WO 92/00799 (Kem-En-Tec, UpFront Chromatography A/S) describe adsorbent particles having a structure that is characterised by being pellicular or a conglomerate. This publication discloses a large number of adsorbents for use in fluidised/expanded bed chromatography.

15 WO 97/17132 (Pharmacia Biotech AB (Uppsala, Sweden) describes adsorbents for use in expanded bed chromatography, that is characterised by having a density of more than 1 g/ml and comprising a porous polymer base matrix in which a particulate filler is incorporated. The filler is characterised by having a density ≥ 3 g/ml, but the size of the core material particles "will always be much smaller than the size of the beads". Thus, the
20 density of the beads are normally just above 1.0 g/cm³.

Also described in the literature (oral presentation by E. Boschetti, BioSeptra, on Second International Conference on Expanded Bed Adsorption, Napa Valley; CA, USA, 21-23 June, 1998, see conference abstract book, page 14) is the use of small, high density
25 particles suitable for fluid bed applications. The adsorbents described are designed to reduce the diffusion distance in a porous media inside the adsorbents. The adsorbents described are favourable to rapid diffusion and therefore compatible with high flow rates.

The adsorbent media commercially available today for fluidised/expanded bed
30 chromatography has mainly been developed for protein purification. A fraction of the media has a high density (>1 g/ml) to ensure the sedimentation properties needed. The high density fraction is ideally inert and non corrosive under the conditions used during the particular purification. The high density fraction is combined with a polymer phase with an open pore structure where the target molecule (usually a protein) of interest can bind
35 to a ligand coupled to the polymer. The target molecule is able to diffuse into the pores.

Thereby, the target molecule is exposed to binding sites in the whole volume of the polymer phase. The target bio-macromolecules described in the method here, e.g. plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA, virus DNA and viruses themselves, and even bacteria are not able to diffuse into the pores of the commercially available media
5 designed for expanded bed chromatography. Therefore is the binding likely to occur mainly to the surface of the media. With the media available today this constitute an important limitation of capacity, because of their relatively low available surface areas.

WO 97/29190 describes a technique for production of highly purified plasmid DNA in *E. Coli*, which method includes growing plasmid containing cells to a high bio-mass in exponential growth, and lysing the cells by raising the pH of the culture to a carefully controlled pH value in which chromosomal DNA is denatured, but plasmid DNA is reversibly renatured. The plasmid containing feedstock is subsequently processed on a diethylaminoethyl (DEAE) anion exchanger in an expanded bed process.

15

Journal of Chromatography A, 806 (1998) 31-45 describes preparative purification of super-coiled plasmid DNA using quaternary amino ethyl (QAE) anion exchange chromatography.

20 BRIEF DESCRIPTION OF THE INVENTION

Thus the problem behind the present invention is to provide improved materials for fluidised bed adsorption or expanded bed adsorption, in particular materials for the purification of bio-macromolecules.

25 The present invention, thus, provides a method for the use of fluidised bed adsorption or expanded bed adsorption as a first capture step for recovery of bio-macromolecules, e.g. plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA, viral DNA and viruses themselves, and even bacteria, from crude biologically feedstock, e.g. recovery of plasmid DNA from an *E. Coli*, lysate feedstock. Novel particulate materials are also described.

30

A first objective is to provide a particulate material (an adsorbent media) that have an improved binding capacity for bio-macromolecules, e.g. plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA, virus DNA, viruses as such and bacteria, through a hitherto unrealised combination of particle size, particle density and pendant groups (ligands) thereby

35 offering certain advantages in chromatographic processes such as fluid bed

processes. Thus, the present invention also provides a particulate material having a density of at least 2.5 g/ml, where the particles of the particulate material have an average diameter of 5-75 μm , and the particles of the particulate material are essentially constructed of a polymeric base matrix and a non-porous core material, said core material having a density of at least 3.0 g/ml, said polymeric base matrix including pendant groups which are positively charged at pH 4.0 such as at pH 6.0 or which are affinity ligands for a bio-molecule.

A second objective of the invention is to provide a method that can handle large scale production of bio-macromolecules, e.g. plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA, virus DNA and viruses themselves, and even bacteria from crude feedstock using fluidised/expanded bed adsorption as a first capture step. Thus, the present invention provides a method for the isolation or purification of a bio-macromolecule, wherein said bio-macromolecule is adsorbed to a particulate material as defined in any of the claims 1-15.

Application of the materials is generally envisaged to be carried out in non-packed systems such as non-packed columns or non-packed reactors and contactors of different kinds.

20

It is especially envisaged that the materials can be used within the fields of expanded bed processes and fluidised bed processes as well as within processes relating to turbulent fluid beds, batch adsorption and batch elution and batch adsorption followed by expanded bed elution. As will be understood, the materials can be used in quite a wide range of chromatographic processes, however it should be mentioned that the present materials are not intended for packed bed applications.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present inventors have discovered a method that gives high dynamic capacity in capture of bio-macromolecules in fluidised/expanded bed adsorption. The method is able to handle large volumes of crude feedstock containing the target bio-macromolecule.

The term bio-macromolecule is intended to mean any entity of biological origin having a molecular weight of at least 20,000 D, e.g. plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA, virus DNA or viruses themselves, and even bacteria. It should be understood that modified variants and analogues of these entities are also possible within the scope of the term as long as the modification or analogues maintain the character of the native bio-macromolecule. The bio-macromolecules to be isolated/purified according to the present invention preferably have a molecular weight of at least 50,000 D, such as at least 100,000 D or at least 500,000 D such as at least 5,000,000. As an example, in E. Coli the molecular weight will typically be 4,200,000 base pairs corresponding 2.7×10^9 D. It will be appreciated that no definite upper limit for the molecular weight applies as the bio-macromolecules also include entire cells. However, with respect to nucleic acids, e.g. plasmid DNA, chromosomal DNA, RNA, virus DNA, etc. the "molecular diameter" is typically in the range of 0.5-5.0 μm . Viruses typically have a "diameter" in the range of 50-100 nm.

15

Particulate material

As mentioned above, the present invention, i.a., relates to a particulate material useful for the isolation/purification of bio-macromolecules, i.e. a particulate material having a density of at least 2.5 g/ml, where the particles of the particulate material have an average diameter of 5-75 μm , and the particles of the particulate material are essentially constructed of a polymeric base matrix and a non-porous core material, said core material having a density of at least 3.0 g/ml, said polymeric base matrix including pendant groups which are positively charged at pH 4.0 or which are affinity ligands for a bio-molecule.

25

In the present context, the terms "adsorbents", "particulate material" and "adsorption media" are used synonymous.

In the present context the expression "conglomerate" is intended to designate a particle of a particulate material, which comprises beads of core material of different types and sizes, held together by the polymeric base matrix, e.g. a particle consisting of two or more high density particles held together by surrounding agarose (polymeric base matrix). The expression "pellicular" is intended to designate a composite of particles, wherein each particle consists of only one high density core

material coated with a layer of the polymeric base matrix, e.g. a high density stainless steel bead coated with agarose (see Figure 1).

It is believed that the relatively small diameter of the particles combined with the high
5 density play an important role for the useful properties of the particulate material, in particular the useful properties in the isolation/purification of bio-macromolecules in fluidised bed processes. Thus, the average diameter of the particles of the particulate material is 5-75 μm , such as in the range of 10-60 μm , such as in the range of 12-49 μm , more preferable in the range of 20-40 μm .

10

Furthermore, it is believed that a relatively narrow particle size distribution is advantageous (bearing in mind that a certain breadth of the distribution is advantageous when the material is to be use in a fluidised bed set-up), thus, it is believed that at least 95% of the particles should have a diameter in the range of 5-80 μm , such as 15-45 μm ,
15 preferably in the range of 20-40 μm .

As mentioned above, the high density of the particles appears to be extremely relevant, thus, in general, the density should be at least 2.5, e.g. at least 3.0, such as at least 3.5, preferably in the range of 3.5-10.0 g/ml.

20

The high density is primarily obtained by inclusion of a high proportion of a dense non-porous core materials, preferably having a density of at least 3.0 g/ml, such as at least 5.0, preferably in the range of 6.0-12.0 g/ml. This will result in particles which are pellicular or a conglomerate in composition. Examples of suitable non-porous core
25 materials are inorganic compounds, metals, elementary non-metals, metal oxides, non-metal oxides, metal salts and metal alloys, etc. as long as the density criteria above are fulfilled. Examples of such core materials are metal silicates metal borosilicates; ceramics including titanium diboride, titanium carbide, zirconium diboride, zirconium carbide, silicon carbide, aluminium nitride, silicon nitride, titanium nitride, yttrium
30 oxide, silicon metal powder, and molybdenum disilide; metal oxides and sulphides, including magnesium, aluminium, titanium, vanadium, chromium, zirconium, hafnium, manganese, iron, cobalt, nickel, copper and silver oxide; non-metal oxides; metal salts, including barium sulphate; metallic elements, including zirconium, titanium, hafnium, vanadium, chromium, manganese, iron, cobalt, nickel, indium, copper,
35 silver, gold, palladium, platinum, ruthenium, osmium, rhodium and iridium, and alloys

of metallic elements, such as alloys formed between said metallic elements, e.g. stainless steel; crystalline and amorphous forms of carbon, including graphite, carbon black and charcoal. Preferred are steel and titanium beads such as stainless steel beads.

5

It is preferred that the core material of at least 95% of the particles is a steel bead having a diameter in the range of 2-40, such as 15-38 μm , preferably 15-35 μm .

Furthermore, it is preferred that at least 95% of the particles comprises one non-porous
10 core material having a diameter which is at least 0.70, such as at least 0.80, preferably at least 0.85, of the diameter of the particle.

Alternatively, the core material is constituted by more than one bead, e.g. beads having a diameter of less than 20 μm .

15

Typically, the core material constitutes 10-99%, preferably 50-95%, of the volume of the particles, and the polymer base matrix constitutes 1-90%, preferably 5-50%, of the volume of the particle.

20 When the core material of a large proportion of the particles (> 95%) is constituted by one bead, the polymeric base matrix is typically less than 50 μm in thickness (the geometrical distance between the core material and the surface of the particle) and preferable less than 20 μm , even more preferable less than 10 μm , and most preferable less than 5 μm in thickness. In one embodiment, it is envisaged that the
25 polymeric base matrix may constitute a mono molecular layer covering the core material. Thus, in this instance, it is contemplated that the polymeric matrix may be replaced with low-molecular weight species having an predominant affinity for the core material. This affinity between the low-molecular species and the core material may be improved by surface treatment of the core material, e.g. by organosilylation
30 of ceramic materials. The monomolecular layer may also be covalently coupled to the surface of the core material by chemical means known per se.

Another important feature of the present invention is the fact that the polymeric base matrix comprises either chargeable pendant groups or affinity ligands for a bio-

macromolecule as pendant groups. It is also possible to combine the two sub-types of pendant groups. It is currently preferred that the pendant groups comprise chargeable moieties selected from polyethyleneimine, modified polyethyleneimine, poly(ethyleneimine/oxyethylene), quaternary aminoethyl (QAE) and diethylaminoethyl (DEAE). Such groups may be linked to the polymeric base matrix by means of a divinyl sulphone or an epichlorohydrin linker or by other means of linking known *per se* or by using the chloride corresponding to the group. The first-mentioned possibility is particularly relevant for chargeable moieties like polyethyleneimines, modified (e.g. alkylated) polyethyleneimines and poly(ethyleneimine/oxyethylene)s. The corresponding chloride is especially relevant for chargeable groups like quaternary aminoethyl (QAE) and diethylaminoethyl (DEAE).

For the binding of bio-macromolecules to the surface of the particulate material according to the invention, a large number of different ligands known *per se* may be employed by coupling to the polymer phase, directly or by the below-mentioned activating groups. Positively charged ion exchange ligands are well suited for the binding of nucleic acids such as DNA and RNA, well known ligands being DEAE, QAE, PEI, and other amino group containing ligands. However, also intercalating ligands may be employed as well as sequence specific ligands such as complementary DNA/RNA strands and artificial oligonucleotides such as PNA.

20

Polyclonal and monoclonal antibodies, synthetic peptides and other synthetic chemical oligomers, lectins, carbohydrates and hydrophobic ligands may also be relevant for the binding of virus, bacteria and other bio-macromolecules.

Such affinity ligands, like the chargeable moieties, may be linked to the base matrix by method known to the person skilled in the art, e.g. as described in "Immobilized Affinity Ligand Techniques" by Hermanson et al., Academic Press, Inc., San Diego, 1992. In cases where the polymeric base matrix does not have the properties to function as an active substance, the polymeric base matrix (or matrices where a mixture of polymers are used) may be derivatised to function as an active substance in the procedures of activation or derivatisation. Thus, materials comprising hydroxyl, amino, amide, carboxyl or thiol groups may be activated or derivatised using various activating chemicals, e.g. chemicals such as cyanogen bromide, divinyl sulfone, epichlorohydrin, bisepoxyranes, dibromopropanol, glutaric dialdehyde, carbodiimides, anhydrides, hydrazines, periodates, benzoquinones, triazines, tosylates, trisylates, and diazonium ions.

In a preferred embodiment, the pendant group is a polyethyleneimine chain, more preferably a polyethyleneimine chains having an weight average molecular weight of at least 10,000 D, such as 50,000-2,000,000 D.

5

It is also preferred, irrespective of whether the pendant group is a polyethyleneimine, that the pendant groups form a tentacular structure on the surface of the particle. A tentacular surface structure is preferred to increase the surface area and/or the binding sites for large bio-macromolecules themselves. It should be understood that moieties like

10 polyethyleneimine may form a coiled structure which is believed to facilitate the adsorption of bio-macromolecules. Other ligands suitable for capture of bio-macromolecules such as plasmid DNA are the DEAE and QAE. They themselves do not construct a tentacular structure when coupled to an adsorbent media. In combination with

15 enhanced surface area. Also other low molecular weight ligand, e.g. oligonucleotides, can be useful, in particular in combination with a tentacular surface structure.

The polymeric base matrix is used as a means of covering and keeping multiple (or a single) core material together and as a means for binding the active substance. Thus,

20 the polymeric base matrix is to be sought among certain types of natural or synthetic organic polymers, typically selected from

- A) natural and synthetic polysaccharides and other carbohydrate based polymers, including agar, alginate, carrageenan, guar gum, gum arabic, gum ghatti, gum
- 25 tragacanth, karaya gum, locust bean gum, xanthan gum, agaroses, celluloses, pectins, mucins, dextrans, starches, heparins, chitosans, hydroxy starches, hydroxypropyl starches, carboxymethyl starches, hydroxyethyl celluloses, hydroxypropyl celluloses, and carboxymethyl celluloses.
- B) synthetic organic polymers and monomers resulting in polymers, including acrylic
- 30 polymers, polyamides, polyimides, polyesters, polyethers, polymeric vinyl compounds, polyalkenes, and substituted derivatives thereof, as well as copolymers comprising more than one such polymer functionally, and substituted derivatives thereof; and
- C) mixture thereof.

A preferred group of polymeric base matrices are polysaccharides such as agarose.

The ideal and preferred shape of a single particle is substantially spherical. The overall shape of the particles is, however, normally not extremely critical, thus, the particles can have other types of rounded shapes, e.g. ellipsoid, droplet and bean forms. However, for certain applications (e.g. when the particles are used in a fluidised bed set-up), it is preferred that at least 95% of the particles are substantially spherical.

10 In one preferred embodiment, the particulate material has a density of in the range of 3.2-5.0 g/ml, where the particles of the particulate material have an average diameter of 15-45 μm , and the particles of the particulate material are essentially constructed of a polysaccharide base matrix and a core material, said core material having a density in the range of 6.0-12.0 g/m^3 , said polysaccharide base matrix including pendant chains of
15 polyethyleneimine, modified polyethyleneimine or poly(ethyleneimine/oxyethylene), said pendant groups forming a tentacular structure on the surface of the particle.

In a further preferred embodiment, the present invention provides to a particulate material having a density of at least 2.5 g/ml, where the particles of the particulate material have
20 an average diameter of 5-75 μm , and the particles of the particulate material are essentially constructed of a polymeric base matrix selected from polysaccharides, preferably agarose, and a non-porous core material, said core material having a density in the range of 6.0-12.0 g/ml where at least 95% of the particles comprises one non-porous core material bead having a diameter which is at least 0.70 of the diameter of the particle,
25 said polymeric base matrix including pendant groups which are positively charged at pH 4.0 or which are affinity ligands for a bio-molecule.

Preparation of the particulate material according to the invention can be performed by various methods known *per se* (e.g. by conventional processes known for the person
30 skilled in the art, see e.g. EP 0 538 350 B1 (UpFront Chromatography A/S) or WO 97/17132 (Pharmacia Biotech AB)), for example by block polymerisation of monomers; suspension polymerisation of monomers; block or suspension gelation of gel-forming materials, e.g. by heating and cooling (e.g. of agarose) or by addition of gelation "catalysts" (e.g. adding a suitable metal ion to alginates or carrageenans); block or
35 suspension cross-linking of suitable soluble materials (e.g. cross-linking of dextrans,

- celluloses, or starches or gelatines, or other organic polymers with e.g. epichlorohydrin or divinyl sulphone); formation of silica polymers by acidification of silica solutions (e.g. block or suspension solutions); mixed procedures e.g. polymerisation and gelation; spraying procedures; and fluid bed coating of density
- 5 controlling particles; cooling emulsions of density controlling particles suspended in polymeric base matrices in heated oil solvents; or by suspending density controlling particles and active substance in a suitable monomer or copolymer solution followed by polymerisation.
- 10 In a particular preferred embodiment (which appears to be generally applicable for the preparation of the particulate material according to the invention), a particulate material comprising agarose as the polymeric base matrix and steel beads as the core material is obtained by heating a mixture of agarose in water (to about 90°C), adding the steel beads to the mixture and transferring the mixture to a hot oil (e.g. vegetable
- 15 oils), emulsifying the mixture by vigorous stirring (optionally by adding a conventional emulsifier) and cooling the mixture. It will be appreciated by the person skilled in the art, that the particle size (i.e. the amount of polymeric base matrix (here: agarose) which is incorporated in each particle can be adjusted by varying the speed of the mixer and the cooling process.
- 20
- As will be apparent from the following, the particulate material is highly useful for use in any chromatographic processes, in particular in fluidised bed adsorption processes.

The method

25

- A column designed for fluidised/expanded bed chromatography is used for the process, e.g. a column with a distribution plate in the inlet, or a column where the raw material is distributed properly in a local mixing zone in the bed by a mechanical stirrer. The amount of feedstock, and thereby the amount of adsorbent needed,
- 30 determines the size of the column needed for the purification. A suitable column can be the commercially available FastLine™ columns from UpFront Chromatography A/S, Denmark, or as illustrated in EP 0 538 350 (UpFront Chromatography A/S).

Fluidisation or expansion of the high density particulate materials (adsorbents) according to the invention inside a reactor gives the possibility to handle crude feedstock. In fluidisation/expansion the adsorbents are lifted up by an upward liquid flow of buffer or feedstock. The expanded volume between the fluidised adsorbents
5 allows feedstock comprising insoluble impurities to pass through the reactor without clogging the system. Thus, adsorbent particles having a density larger than the fluid and moving downwards due to gravity may be kept in a free, fluid phase by an upward flow of fluid.

10 Purification of nucleic acid (such as DNA, e.g. plasmid DNA) using chargeable moieties such as DEAE, PEI and QAE is advantageous in that the interaction between the negatively charged phosphate groups in the DNA molecule and positively charged amino groups in DEAE, PEI and QAE facilitates the separation. Other positively charged ligands is believed to provide the same advantages.

15

As mentioned above, the present invention also provides a method for the isolation or purification of a bio-macromolecule, wherein said bio-macromolecule is adsorbed to a particulate material as defined above and in the claims. It should be understood that the particulate material preferably is present in fluidised form in a fluid bed column.

20

In a more specific embodiment, the invention relates to a method for the purification or isolation of bio-macromolecule, the method comprising the steps of

(a) contacting a feedstock comprising one or more bio-macromolecules with a fluidised
25 bed of a particulate material as defined above and in the claims;

(b) optionally washing the particulate material in order to separate impurities from the particulate material and the bio-macromolecule(s); and

30 (c) eluting the bio-macromolecule(s) from the particulate material.

The adsorbent is fluidised/expanded in the column with a flow of equilibration buffer that corresponds to 10-500 cm/h and preferable 200-400 cm/h. The equilibration buffer may consists of 10-100 mM buffer (e.g. Tris, acetate, citrate, glycine,
35 carbonate, phosphate) and typically have a pH value between 2.0-13.0 such as 4.0-

8.0, and typically a NaCl concentration in the range between 0.0-0.5 M. Thus, preferably, the fluidised bed of the particulate material is washed with an equilibration buffer prior to contacting with the feedstock. The adsorbent is most conveniently equilibrated in the column and the equilibration buffer is preferably applied at least
5 until the bed is stabilised.

After the stabilisation of the bed, the bio-macromolecule containing feedstock is applied to the fluid bed with a flow rate typically in the range of 100-500 cm/h.

- 10 Typically, a feedstock with bio-macromolecules is pre-treated before it is applied to the fluidised/expanded bed. The pre-treatment is, e.g., pH adjustment, lysis of host cells containing plasmid DNA, cell grinding, precipitation, mechanical removal of solid impurities, etc. Host cells are harvested and destroyed mechanically, e.g. by grinding, or chemically. Usually are cells destroyed by an alkaline lysis with NaOH and SDS.
- 15 The lysis can be followed by a neutralisation often by addition of acetate to the solution. It can be convenient to remove a major part of the cell debris mechanically before applying the raw material to the column.

Generally, the concentration of the bio-macromolecule such as plasmid DNA in the
20 feedstock is in the range of 0.1-3,000 µg/ml, such as in the range of 10-1,000 µg/ml. However, much higher concentrations may be relevant in some systems.

With respect to the preparation of the feedstock, it is preferred that the feedstock which comprises the bio-macromolecule(s) furthermore comprises a salt such as NaCl, KCl,
25 K₂HPO₄ or NaSO₄ in a concentration of 0.0-2.0 M, preferably 0.0-1.0 M, in particular 0.0-0.5 M. Furthermore, the feedstock which comprises the bio-macromolecule(s) typically furthermore comprises a buffer whereby the pH is kept in the range of 2.0-13.0. The buffer may be any one suitable in combination with the bio-macromolecule in question, typically a e.g. Tris, acetate, citrate, glycine, carbonate, phosphate buffer in a concentration of
30 5-100 mM.

As a model system to illustrate the invention and to determine both static and dynamic binding capacities a solution containing calf thymus DNA has been used

(see the examples). The concentration of calf thymus DNA was in the range of 18-2200 µg/ml in a 10mM Tris buffer system at pH 8.0.

Another parameter of importance is the amount of particulate material (adsorbent) used to
5 purify or isolate a certain amount of the bio-macromolecule. Typically, the ratio between the bio-macromolecule and the particulate material (adsorbent) is in the range of 0.1-10.0 mg bio-macromolecule/ml adsorbent.

The effect of NaCl on the binding efficiency can be tested by adding NaCl in varying
10 concentrations in the range of 0.0–3.0 M to the calf thymus containing solution. In feedstock with dilute concentration of DNA it is normally necessary to add NaCl to the feedstock to suppress or prevent cross-linking of the adsorbent particles.

In the case where plasmid DNA is the bio-macromolecule of interest, sophisticated
15 pH adjustments can be used in the pre-treatment process (or as an integral part of the adsorption process - see below) and will normally lead to denaturation of chromosomal DNA while plasmid DNA is reversibly renatured. The level of contaminants can be reduced. Another contaminant is RNA. The level of RNA can be reduced by a treatment of the feedstock with RNase. In the same way can the level
20 of protein contaminants be reduced by a treatment of proteolytic enzymes.

Enzymatic treatment of the feedstock can be performed in various ways, e.g. by adding the enzymes to the feedstock or by applying the feedstock to a fluidised/expanded bed where the enzymatic activity is immobilised onto the fluidised/expanded particles. Enzymatic treatment can also be performed on the
25 eluate from the fluidised/expanded bed chromatographic step, e.g. if the resolution of plasmid DNA and RNA is low, the eluate can be treated with RNase to reduce the level of that contaminant.

The feedstock is normally applied until a target molecule breakthrough of 0 - 100%,
30 preferable 0-50% and most preferable 0-10% is observed.

After adsorption, the particulate material having adsorbed thereto the bio-macromolecule is normally (but optionally) washed (step b) with an aqueous equilibration buffer including NaCl. The equilibration buffer may consist of 10 mM buffer (e.g. Tris,

acetate or citrate) and have a pH value between 2.0-13.0 and a NaCl concentration in the range between 0.0-1.5 M, preferable 0.0-0.5 M.

If desirable, the particulate material having adsorbed thereto the bio-macromolecule is
5 subsequently eluted with a NaCl gradient and/or NaOH buffer (0.001-1.0 M) or a buffer having a pH of 2.0-13.0 (such as e.g. Tris, acetate, citrate, glycine, carbonate, phosphate) or aqueous solutions of monosaccharides. The gradient typically goes from 0-3.0 M NaCl, more preferable 0-2.0 M NaCl and most preferable 0-1.0 M NaCl. Elution can take place in fluidised/expanded or packed bed, fluidised/expanded
10 bed is preferred.

Particularly interesting bio-macromolecules to be isolated or purified by the present method are nucleic acids, in particular plasmid DNA.

15 Another interesting application of the materials according to the invention is the use as carriers for cells. As it has been illustrated in example 11, the materials are suitable for capture of cells (illustrated by yeast cells), and it is therefore contemplated that the materials also can be used as micro-carriers for cells in, e.g., fermentation processes.

20 The high density and small particle size of the material may thus be beneficially exploited as carriers for living cells in stabilised expanded bed, turbulent fluid bed or batchwise fermentation systems. In this instance it will be a significant advantage that the material has a very high surface area due to the small particle size so that a maximum number of cells can attach per litre of material and at the same time have direct access to the
25 nutrient medium. This is in strong contrast to a number of known carriers, which allow cells to attach inside large pores of a particulate material and thus become restricted with respect to the accessibility of nutrients. The small particle size of the material according to this invention *combined* with the high density allows a fast separation of the immobilised cells whenever this is wished during or at the end of the fermentation process.

30

Based on the ability to attract cells and bio-molecules, it is also envisaged that the materials can be used as micro-carriers for living and dead cells as well as enzymes and other bio-catalysts in applications where the catalytic activity of the cells or enzymes and other bio-catalysts are utilised. As should be understood from the above, cells, enzymes
35 or other bio-catalysts may be adsorbed to the particulate material either by pendant

groups which are positively charged at pH 4.0 or pendant groups which are affinity ligands for bio-molecules. When affinity ligands for bio-molecules are used as pendant groups, it will be possible to discriminate between various types of cells, enzymes or other bio-catalysts based on the recognition between the ligand and the target in question.

5

In the case of immobilised enzymes or other bio-catalysts it may also be advantageous to utilise a covalent chemical coupling method known per se to attach the enzyme or other bio-catalyst to the material.

- 10 Thus, the present invention also relates to a particulate material (as defined herein) where each particle carries at least one, preferably a plurality of, cells, enzymes or other bio-catalysts.

FIGURE LEGENDS

15

FIGURE 1. Light microscope photograph of particles having diameters in the range of 20-40 μm . The photograph illustrates the solid non-porous core material (stainless steel - dark) of the particles and the outer polymeric base matrix (agarose - translucent) (UFC PEI(20-40)).

20

FIGURE 2. Ethidium bromide-stained agarose gel of fractions from the expanded bed experiment described in example 8. Lane 1: alkaline lysate feedstock; lanes 2-3: RNA elution peak; lanes 4-8: DNA elution peak; lane 9: stripping peak; lane 10: plasmid DNA digested with *Bam*HI; lane M: λ digested with *Hind*III and *Eco*RI. CCC: supercoiled

25 plasmid DNA.

FIGURE 3. Ethidium bromide-stained agarose gel of fractions from the expanded bed experiment described in example 9. Lane 1: alkaline lysate feedstock; lane 2: RNA elution peak; lane 3: DNA elution peak; lane 4: stripping peak; lane M: λ digested with *Hind*III and

30 *Eco*RI. CCC: supercoiled plasmid DNA.

FIGURE 4. Ethidium bromide-stained agarose gel of samples from experiment described in example 10. Lanes 1, 5 & 9: molecular weight marker; lanes 2-4: starting material containing pcDNA3, pV1 and pV2, respectively; lanes 6-8: eluted pcDNA3, pV1 and pV2,

35 respectively.

FIGURE 5. Stepwise elution of yeast cells (from experiment described in example 12) using 50 mM Tris/HCl, pH 7.0 containing 0.5 M NaCl followed by the same buffer containing 1 M NaCl. Optical density at 600 nm (—), NaCl concentration (---).

5

EXAMPLES

Example 1

In this example is the preparation of a calf thymus DNA solution described. The solution is used in example 4-7 for model binding studies.

10

The solutions of calf thymus DNA used in example 4-7 for model studies are prepared in the following way:

100 mg calf thymus DNA (Sigma D 1501) is added to 50 ml 10 mM Tris/HCl pH 8.0.

15 The solution is placed at room temperature over night. The solution is sonicated 30 minutes. The solution is then fractionated in aliquots of 2 ml. The aliquots are spinned at 13000 rpm for 5 minutes. The supernatants from the centrifuged aliquots are transferred to new tubes and stores at -20°C .

20 To determine the concentration of DNA the samples are measured at $A_{260\text{nm}}$ using Milli Q water as blank. $A_{260\text{nm}} = 1$ corresponds to a DNA concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$.

The majority of the DNA is between 3000 and 20,000 base pair as shown by gel electrophoresis.

25

Example 2

In this example is the derivatisation of the adsorbents from UpFront Chromatography used in example 3-7

The term "UFC PEI (20-40)" refers to an adsorption media where the population size is within the range 20-40 μm , and PEI indicates that polyethyleneimine is used as the pendant group (ligand). The media is prepared from a population of adsorbents having a pellicular structure. They have a core material consisting of stainless steel beads (1-PSR-2, Anval, Sweden) (preferably only one bead per particle) sized in the range 22-44 μm . A layer of agaros surrounds the stainless steel core bead. The population is sieved to get a

population size in the range of 20–40 μm . (An example of this particulate material is illustrated in Figure 1.)

The term "UFC PEI (100-300)" refers to an adsorption media where the population size is with in the range 100-300. PEI indicates that polyethyleneimine is used as the pendant group (ligand). The media is prepared from a population of adsorbents having a pellicular structure. They have a core material consisting of glass beads (preferably only one bead per particle) from sized in the range 90-150 μm . A layer of agarose surrounds the glass bead core. The population is sieved to get a population size in the range of 100-300 μm (reference material).

The adsorbents are derivatised with PEI in the following way:

50 ml adsorbents (20–40 μm or 100-300 μm), 40 ml Milli Q water (75 °C), 6.3 ml epichlorohydrin and 5 ml 32.5 % NaOH is mixed and the solution is shaken for 3.5 hours.

Subsequent is the adsorbents washed with Milli-Q water. The washed epoxy activated adsorbents are coupled with PEI in the following way: 50 ml epoxy activated adsorbents plus 50 ml PEI solution 0.4 g/ml, pH 10.5 is shaken over night. Subsequent is the PEI derivatised adsorbents washed with Milli-Q water.

The ionic capacity of UFC PEI (20–40) is 0.14 mmol (Cl^-)/ml adsorbent.

The ionic capacity of UFC PEI (100-300) is 0.185 mmol (Cl^-)/ml adsorbent.

The term "UFC DEAE (20-40)" refers to an adsorption media where the population size is with in the range 20–40 μm as described above, except that DEAE is used as the pending group (ligand).

25

The term "UFC DEAE (100-300)" refers to an adsorption media where the population size is with in the range 100-300 as described above, except that DEAE is used as the pendant group (ligand).

30 The adsorbents are derivatised with DEAE in the following way:

50 ml adsorbents (20–40 μm or 100-300 μm), 40 ml Milli Q water (75 °C), 4.3 ml epichlorohydrin and 2.5 ml 32.5 % NaOH is mixed and the solution is stirred for 3 hours. The solution is heated to 65 °C and 6.7 g NaOH and 6.1 g DEAE is added to the solution. The solution is stirred for 1 hour. Subsequent is 5.8 ml 32.5% NaOH and 6.1 g DEAE

added 2 times with intervals of 1 hour. The heating is stopped and the solution is stirred over night.

The ionic capacity of UFC DEAE (20-40) is 0.05 mmol (Cl⁻)/ml adsorbent.

The ionic capacity of UFC DEAE (100-300) is 0.08 mmol (Cl⁻)/ml adsorbent.

5

In the batches produced in this example is the density of the 20-40 µm adsorbents (stainless steel core) 3.7 g/ml, and the density of the 100-300 µm adsorbents (glass core) 1.35.

10 Example 3

In this example is expansion properties described for UFC PEI (20-40).

Equipment: A Fastline™10 (UpFront Chromatography) and a column tube length of 30 cm, a Verder pump (Pericor) and a magnetic stirrer (Mini MR IKA Labortechnik).

Method: The settled bed height (h_0) is 5.0 cm. Milli-Q water is used to transfer the

15 adsorbents into the column as well as the fluid used during the experiment. The column is levelled and the adjustable outlet is placed at the very top of the column. The pump and the magnetic stirrer are started. The speed of the magnetic stirrer is resulting in a local mixing zone in the bottom of the column that is less than 1 cm bed height. The flow rate is adjusted so that the bed expands about 3 times (approximately 4 ml/min). The bed is
20 visually inspected to see if the bed is stable and there is no channelling. The expansion data are collected by measuring the expansion (h) that corresponds to a certain flow rate. The measurements are made at different flow rates. The degree of expansion is measured 15 minutes, where the bed height is stable after an adjustment of the flow rate.

| Flow rate (ml/min) | Flow rate (cm/h) | Degree of expansion (h/h_0) |
|--------------------|------------------|---------------------------------|
| 0 | 0 | 1.0 |
| 0.5 | 38 | 1.3 |
| 2.0 | 153 | 2.2 |
| 4.0 | 305 | 3.3 |
| 5.3 | 405 | 4.5 |
| 6.0 | 458 | 5.1 |

25

Comment/conclusions:

Unfavourable bed expansion characteristics of typical small diameter beads is negated by the use of a very high density support (3.7 mg/ml). The degree of expansion is below 3.5,

when the flow rate is in the rang 60-300 cm/h, which is a typical rang for running fluidis d/expand d bed chromatography.

Example 4

- 5 In this example is static binding capacities of calf thymus DNA described. Experiments to describe the adsorption kinetic is performed. Comparative studies of different anion exchangers are performed.

Kinetic studies:

6 identical incubations where performed:

- 10 400 μ l 2.1 mg calf thymus DNA/ml, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 is added to 0.1 ml UFC PEI (20-40) adsorbent. This means that 8.4 mg DNA has been added per ml of adsorbent. The adsorbent is equilibrated in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. The incubations where stopped at different times; after 5, 10, 30, 60, 120 and 300 seconds. The solutions with DNA where analysed at $A_{260\text{ nm}}$ and compared with the $A_{260\text{ nm}}$ value of the solution before incubation.

15

| Incubation time (s) | Absorbance (260 nm) | % adsorbed | mg DNA adsorbed/ml adsorbent |
|---------------------|---------------------|------------|------------------------------|
| 5 | 23.1 | 46 | 3.9 |
| 10 | 20.2 | 53 | 4.5 |
| 30 | 15.5 | 64 | 5.4 |
| 60 | 15.4 | 64 | 5.4 |
| 120 | 15.1 | 65 | 5.5 |
| 300 | 14.5 | 66 | 5.5 |

$A_{260\text{ nm}}$ in the DNA solution before incubation was measured to be 42.8 which corresponds to 2.1 mg DNA/ml.

Comparative studies of binding efficiencies of different anion exchangers:

- 20 Static experiment with DNA:

400 μ l 2.1 mg calf thymus DNA/ml, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 is added to 0.1 ml adsorbent. This means that 8.4 mg DNA has been added per ml of adsorbent. The adsorbent is equilibrated in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. The incubations where stopped after 300 seconds. Th solutions with DNA where analysed at $A_{260\text{ nm}}$ and compared with the $A_{260\text{ nm}}$

- 25 value of the solution before incubation. $A_{260\text{ nm}}$ in the DNA solution befor incubation was measured to be 42.8 corresponding to 2.1 mg DNA/ml.

Static experiments with bovine serum albumin (BSA):

4000 μ l 2.2 mg BSA/ml, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 is added to 0.1 ml adsorbent. This means that 88 mg BSA has been added per ml of adsorbent. The adsorbent is equilibrated in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. The incubations were stopped after 300 seconds. The solutions with BSA were analysed at $A_{280\text{ nm}}$ and compared with the $A_{280\text{ nm}}$ value of the solution before incubation. $A_{280\text{ nm}}$ in the BSA solution before incubation was measured to be 1.41.

| Adsorbent/ ligand | Particle size ^a (μ m) | Ionic capacity ^a (mmol (Cl ⁻)/ml adsorbent) | Binding capacity (mg BSA/ml adsorbent) | Binding capacity ^b (mg DNA/ml adsorbent) |
|-----------------------|--|--|--|---|
| UFC PEI | 20-40 | 0.14 | 46 ^b | 5.5 |
| UFC PEI | 100-300 | 0.18-0.20 | 90 ^c | 0.6 |
| UFC DEAE | 20-40 | 0.05 | 22 ^b | 2.7 |
| UFC DEAE | 100-300 | 0.05-0.10 | 70 ^c | 0.3 |
| Q HyperD (M) | Av. 50 | 0.14-0.18 | 100 ^c | 1.6 |
| DEAE Sephacrose FF | 45-165 | 0.11-0.16 | 110 ^c | 0.2 |
| Q Sepharose FF | 45-165 | 0.18-0.25 | 120 ^c | 0.5 |
| STREAMLINE DEAE | 100-300 | 0.13-0.21 | 40-55 ^c | 0.2 |

a) manufacture's figures

10 b) determined in static binding experiments

c) manufacturer's figures for dynamic capacities

Comments/conclusions:

In comparative static binding tests with high molecular weight calf thymus DNA, the support according to the invention, derivatised with DEAE and PEI in particular, possesses DNA binding capacities significantly higher than those of commercially available anion exchange media. Not surprisingly, these improvements were achieved at the expense of reduced capacities for protein adsorption given the thin layer of agarose on the prototype support.

20 The kinetics of equilibrium adsorption of DNA to these supports were extremely fast (10-30 seconds).

Example 5

In this example are static binding experiments on UFC PEI (20-40) performed with a solution of calf thymus DNA having a concentration of DNA (about 20 µg/ml) that is about 5 the concentration of plasmid DNA in fermentation liquors. The experiments are performed with varying concentrations of NaCl.

The adsorbent is equilibrated in 10 mM Tris/HCl, pH 8.0.

The calf thymus DNA solution is made from a stock solution (2.0 mg/ml, 10 mM Tris, pH 8.0) by dilution with a 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 buffer. NaCl is added to fractions of the diluted solutions to get varying concentrations NaCl (see incubation conditions):

Incubation conditions (for 10 minutes):

- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 15 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 25 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 75 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 0.2 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 0.75 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 20 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 1.0 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 1.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 2.1 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 4.0 ml 20 µg DNA/ml, 3.1M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 0.8 mg DNA is incubated per ml adsorbent. Absorbance is detected after 10 minutes
- 25 incubation time at 260 nm and compared to the absorbance in the DNA solutions before incubation. The absorbents where visually inspected after incubation to see if there where cross-linking or flocculation of the single beads.

| NaCl concentration (mM) | Capacity (mg/ml adsorbent) | Cross-linking (yes/no) |
|-------------------------|----------------------------|------------------------|
| 0 | 0.6 | Yes |
| 25 | 0.7 | Yes |
| 75 | 0.7 | Yes |
| 200 | 0.6 | Yes |

| | | |
|------|------|----|
| 500 | 0.7 | No |
| 750 | 0.05 | No |
| 1000 | 0 | No |
| 1500 | 0 | No |
| 2100 | 0 | No |
| 3100 | 0 | No |

Determination of the DNA binding capacity of UFC PEI (20-40) from a 20 µg DNA/ml solution with 0.5 M NaCl

Incubation conditions (for 60 min):

- 5 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 10 ml 20 µg DNA/ml, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 20 ml 20 µg DNA/ml, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 30 ml 20 µg DNA/ml, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
 0.1 ml UFC PEI (20-40) + 40 ml 20 µg DNA/ml, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
- 10 The absorbance at 260 nm is measured in the incubated solution after 60 minutes, and compared to the absorbance at 260 nm in the DNA solution before incubation.

| DNA solution (ml) | DNA added/ml adsorbent | A (260nm) after incubation | % adsorbed | Adsorption efficiency (mg DNA/ml adsorbent) |
|-------------------|------------------------|----------------------------|------------|---|
| 10 | 2.0 | 0.034 | 92 | 1.94 |
| 20 | 4.0 | 0.089 | 79 | 3.16 |
| 30 | 6.0 | 0.140 | 67 | 4.02 |
| 40 | 8.0 | 0.224 | 49 | 3.76 |

The absorbance at 260 nm is measured in the solution before the incubations: 0.40 which corresponds to a concentration of 20 µg/ml.

15

Comments / conclusions:

In batch adsorption studies at low DNA concentrations (20 µg/ml) we have observed extensive gelling of the prototype PEI-based anion exchanger whereas this effect was not seen at much higher DNA concentrations, e.g. 2 mg/ml. The addition of NaCl to a molarity of about 0.5 prevented this from occurring without reducing binding capacity. However,

when the NaCl concentration was raised above 0.5 M a sharp decrease in DNA adsorption was observed.

In static binding tests with DNA concentration of 20 µg/ml and 0.5 M NaCl the capacity of the adsorbent is about 4 mg/ml adsorbent.

5

Example 6

In this example is a breakthrough curves made for UFC PEI (20-40) in fluidised/expanded bed adsorption with a DNA solution of about 20 µg/ml DNA, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 described.

10 Equipment: Pump, column 1 cm in diameter, magnetic stirrer

Method: Adsorbent: UFC PEI (20-40). Equilibrated adsorbent is filled into the column already containing a magnetic bar. The adsorbent is equilibrated with 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. The settled bed height is 4 cm corresponding to 3.2 ml adsorbent. The adsorbent is expanded to 12 cm by a flow rate of 300 cm/min equilibration buffer and the

15 magnetic stirrer is started with a speed that not will result in a mixing zone in the bottom of the column that is more than 1 cm. The adjustable outlet of the column is placed approximately 1 cm above the expanded bed.

The pump inlet is shifted to a DNA solution 18.0 µg/ml DNA, 0.5 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. The run through of the column is collected in 50 ml fractions, which are analysed

20 by $A_{260\text{ nm}}$, and the concentration of DNA, C , is calculated. The absorbance at 260 nm of the DNA solution before it is applied to the column is 0.36 corresponding to a DNA concentration, C_0 , of 18.0 µg/ml.

| Fraction | Total volume of DNA solution applied (ml) | Absorbance in run through | % DNA in run through (C/C ₀) |
|----------|---|---------------------------|--|
| 1 | 50 | 0.000 | 0 |
| 2 | 100 | 0.000 | 0 |
| 3 | 150 | 0.000 | 0 |
| 4 | 200 | 0.000 | 0 |
| 5 | 250 | 0.000 | 0 |
| 6 | 300 | 0.000 | 0 |
| 7 | 350 | 0.000 | 0 |
| 8 | 400 | 0.000 | 0 |
| 9 | 450 | 0.000 | 0 |
| 10 | 500 | 0.000 | 0 |
| 11 | 550 | 0.000 | 0 |
| 12 | 600 | 0.001 | 0.2 |
| 13 | 650 | 0.001 | 0.2 |
| 14 | 700 | 0.002 | 0.5 |
| 15 | 750 | 0.003 | 0.8 |
| 16 | 800 | 0.006 | 2.0 |
| 17 | 850 | 0.011 | 3.0 |
| 18 | 900 | 0.018 | 5.0 |
| 19 | 950 | 0.021 | 6.0 |
| 20 | 1000 | 0.033 | 10.0 |
| 21 | 1050 | 0.053 | 15.0 |
| 22 | 1100 | 0.078 | 23.0 |
| 23 | 1150 | 0.103 | 30.0 |
| 24 | 1200 | 0.128 | 37.0 |
| 25 | 1250 | 0.133 | 39.0 |

Comments/conclusion:

There is 10% break through after 1000 ml is applied. That corresponds to 18 mg DNA applied. Thereby is the dynamic capacity 5.6 mg/ml adsorbent at 10 % break through.

Example 7

In this example is a breakthrough curves made for UFC PEI (20-40) in fluidised/ expanded bed adsorption with a DNA solution of about 20 µg/ml DNA, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 described.

- 5 Equipment: Pump, column 1 cm in diameter, magnetic stirrer
- Method: Adsorbent: UFC PEI (20-40). Equilibrated adsorbent is filled into the column already containing a magnetic bar. The adsorbent is equilibrated with 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 The settled bed height is 4 cm corresponding to 3.2 ml adsorbent. The adsorbent is expanded to 12 cm by a flow rate of 300 cm/min equilibration buffer and the magnetic
- 10 stirrer is started with a speed that does not result in a local mixing zone in the bottom of the column that is more than 1 cm. The adjustable outlet of the column is placed approximately 1 cm above the expanded bed. The pump inlet is shifted to the DNA solution 20.0 µg/ml DNA, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0. The run through of the column is collected in 50 ml fractions, which are analysed by A 260 nm. The absorbance at 260 nm
- 15 of the DNA solution before it is applied to the column is 0.39 corresponding to a DNA concentration of 19.5 µg/ml.

| Fraction | Total volume of DNA solution applied (ml) | Absorbance of run through at 260 nm | % DNA in run through (C/Co) |
|----------|---|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 50 | 0.000 | 0.0 |
| 2 | 100 | 0.000 | 0.0 |
| 3 | 150 | 0.000 | 0.0 |
| 4 | 200 | 0.000 | 0.0 |
| 5 | 250 | 0.000 | 0.0 |
| 6 | 300 | 0.000 | 0.0 |
| 7 | 350 | 0.000 | 0.0 |
| 8 | 400 | 0.000 | 0.0 |
| 9 | 450 | 0.000 | 0.0 |
| 10 | 500 | 0.000 | 0.0 |
| 11 | 550 | 0.000 | 0.0 |
| 12 | 600 | 0.000 | 0.0 |
| 13 | 650 | 0.000 | 0.0 |
| 14 | 700 | 0.034 | 9.0 |

Comments/conclusion

In the absence of NaCl breakthrough occurred after ~ 4 mg of DNA had been applied per ml of adsorbent. At this point severe gelation was observed and the media, in form of a plug, expanded out of the column. The experiment had to be stopped.

5

Example 8

Separation of RNA and plasmid DNA from neutralised *Escherichia coli* lysates using UFC DEAE (20–40 µm) adsorbent and continuous linear ionic strength gradient elution.

The feedstock used in this example is prepared as follows: an 8.5 kb runaway plasmid
10 (pOU61) is transformed into *Escherichia coli* DH5- α cells and propagated by fermentation. Following fermentation cells are harvested by centrifugation, resuspended in an RNase (100 µg/ml) containing buffer and lysed under alkaline conditions in the presence of sodium dodecyl sulphate. The alkaline lysate is then neutralised with 3 M potassium acetate, pH 5.5 and the plasmid containing liquor drained from underneath a
15 floating floc of denatured proteins and chromosomal DNA. The final DNA, RNA and protein contents of the neutralised lysate are 53 µg/mL, 680 µg/mL and 360 µg/ml respectively.

Equipment: FastLine™10 column, (1 cm in diameter and 30 cm in height), magnetic stirrer, GradiFrac™ System including a HiLoad Pump P-50, a fraction collector and a
20 REC102 chart recorder.

Method: Adsorbent: UFC DEAE (20–40 µm). The adsorbent is added to the column, which already contains a magnetic stirring bar. The adsorbent is washed with 0.1 M NaOH for 1 hour at a linear flow rate of 153 cm/h. The bed is allowed to settle and is left in 0.1 M NaOH overnight. The adsorbent is then equilibrated with 0.8 M potassium acetate,
25 10 mM EDTA, pH 5.5. The settled bed height is 5.5 cm corresponding to 4.3 ml adsorbent. The adsorbent is expanded to a height of 11.4 cm with equilibration buffer at a linear flow rate of 153 cm/h and the magnetic stirrer is started with a speed of 750 rpm, which is kept constant throughout the experiment. The adjustable outlet of the column is placed approximately 1 cm above the expanded bed. Following equilibration for 2 hours,
30 40 ml of neutralised *E. coli* lysate is pumped through the column at a linear flow rate of 153 cm/h. The adsorbent is then washed with equilibration buffer for 26 min followed by 25 mM potassium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5 until the on-line absorbance signal reaches the base line on the chart recorder. Bound RNA is eluted from the adsorbent in a stepwis manner using 0.66 M NaCl (in 25 mM potassium acetat , 10 mM EDTA, pH 5.5).
35 Plasmid DNA is then eluted by applying a linear ionic strength gradient starting from 0.66

M NaCl (in 25 mM potassium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5) and finishing at 1 M NaCl (in 25 mM potassium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5) in a period of 2 hours. Following elution, material still bound to the adsorbent is removed with a stripping buffer (2 M NaCl, 0.2 M NaOH). The liquid exiting the column is collected in 4 ml fractions and the compositions of
5 each fraction are analysed by electrophoresis and assays for protein, RNA and DNA.

Comments/conclusion:

Complete separation of RNA from DNA is achieved using the conditions described above (Fig. 2), and >95% of the protein is collected during sample loading. Nearly 80% of the supercoiled plasmid DNA applied to the expanded bed of UFC DEAE (20–40 µm)
10 adsorbent is eluted in the applied linear gradient, and is completely free of RNA and protein.

Example 9

Separation of RNA and plasmid DNA from neutralised *Escherichia coli* lysates using UFC
15 DEAE (20–40 µm) adsorbent and stepwise ionic strength gradient elution.

The feedstock used in this example is prepared as follows: an 8.5 kb runaway plasmid (pOU61) is transformed into *Escherichia coli* DH5–alpha cells and propagated by fermentation. Following fermentation cells are harvested by centrifugation, resuspended in an RNase (100 µg/ml) containing buffer and lysed under alkaline conditions in the
20 presence of sodium dodecyl sulphate. The alkaline lysate is then neutralised with 3 M potassium acetate, pH 5.5 and the plasmid containing liquor drained from underneath a floating floc of denatured proteins and chromosomal DNA. The final DNA, RNA and protein contents of the neutralised lysate are 53 µg/mL, 650 µg/mL and 320 µg/mL respectively.

25 Equipment: FastLine™10 column, (1 cm in diameter and 30 cm in height), magnetic stirrer, GradiFrac™ System including a HiLoad Pump P-50, a fraction collector and a REC102 chart recorder.

Method: Adsorbent: UFC DEAE (20–40 µm). The adsorbent is added to the column, which already contains a magnetic stirring bar. The adsorbent is washed with 0.1 M NaOH for 1
30 hour at a linear flow rate of 153 cm/h. The bed is allowed to settle and is left in 0.1 M NaOH overnight. The adsorbent is then equilibrated with 0.8 M potassium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5. The settled bed height is 5.4 cm corresponding to 4.2 ml adsorbent. The adsorbent is expanded to a height of 11.3 cm with equilibration buffer at a linear flow rate of 153 cm/h and the magnetic stirrer is started with a speed of 750 rpm which is kept
35 constant throughout the experiment. The adjustable outlet of the column is placed

approximately 1 cm above the expanded bed. Following equilibration for 2 hours, 40 ml of neutralised *Escherichia coli* lysate is pumped through the column at a linear flow rate of 153 cm/h. The adsorbent is then washed with equilibration buffer for 25 min followed by 25 mM potassium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5 until the on-line absorbance signal reaches the base line on the chart recorder. Bound RNA is eluted from the adsorbent using 0.66 M NaCl (in 25 mM potassium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5). Plasmid DNA is then eluted using 1 M NaCl (in 25 mM potassium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5). Following elution, material still bound to the adsorbent is removed with a stripping buffer (2 M NaCl, 0.2 M NaOH). The liquid exiting the column is collected in 4 ml fractions and the compositions of each fraction are analysed by electrophoresis and assays for protein, RNA and DNA.

Comments/conclusion: By applying a simple stepwise ionic strength gradient elution, separation of RNA from DNA is achieved (Fig. 3). Recovery of supercoiled plasmid DNA is >75%.

Example 10

Affinity capture of plasmid DNA from *Escherichia coli* lysates using UFC (20–40 µm) adsorbent derivatised with an affinity ligand.

A fragment of DNA containing the sequence d(GAA)₁₇•d(TTC)₁₇ is inserted into a commercial expression vector (pcDNA3, Invitrogen, USA) in the *Bst*I 107 I restriction site to generate plasmid pV1 or in *Bst*I 107 I restriction site and in the *Bgl* II restriction site to generate plasmid pV2. Each plasmid is transformed into DH5- α *E. coli* cells and propagated by fermentation.

Following the fermentation cells are harvested and lysed under alkaline conditions in the presence of sodium dodecyl sulphate. The lysate is neutralised and adjusted to binding conditions (2 M NaCl, 0.2 M Acetate buffer; pH 4.5) and to a final DNA content of 8 ± 1 µg/ml.

Method: Adsorbent: UFC (CTT)₇ affinity (20–40 µm). Avidin-coated UFC (20–40 µm) adsorbent is derivatised with 1 nmol of biotin-labelled (CTT)₇ oligonucleotide per ml of matrix to produce the affinity adsorbent.

The affinity adsorbent is washed once with 0.15 M NaCl, 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5 and then equilibrated in 2 M NaCl, 0.2 M potassium acetate buffer, pH 4.5. The adsorbent is then mixed gently by tumbling end-over-end with bacterial lysate containing either pV0, pV1 or pV2 at a ratio of 160 ± 20 µg of DNA per ml of affinity adsorbent. After 20 hours the adsorbent is washed twice with 0.5 volume of 2 M NaCl, 0.2 M potassium

acetate buffer, pH 4.5 and then elution of the plasmid is achieved by incubation for 30 minutes in 0.5 volume of elution buffer (1 M Tris, 1 mM EDTA, pH 10.6). The plasmid-containing supernatant is separated and analysed by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining and visualisation under UV light

5 (Figure 4)

Comments/conclusion: Only plasmids carrying the specific target sequence are captured from the plasmid-containing bacterial lysate by the UFC (20–40 μ m) affinity adsorbent (Fig. 4).

10 Example 11

Yeast cell capture from buffer using UFC DEAE (20–40 μ m) adsorbent.

Equipment: FastLine™ 10 column (1 cm in diameter and 30 cm in height), Verder CD70 pump, magnetic stirrer, spectrophotometer.

Method: Adsorbent: UFC DEAE (20–40 μ m). The adsorbent is added to the column,

15 which already contains a magnetic stirring bar. The adsorbent is washed and equilibrated with 50 mM Tris/HCl pH 7.0 buffer for 2 hours at a linear flow velocity of 153 cm/h. The settled bed height is 4 cm corresponding to 3.15 ml adsorbent. The adsorbent is expanded to a height of 9.5 cm with equilibration buffer at a linear flow rate of 153 cm/h and the magnetic stirrer is started with a speed of 750 rpm, which is kept constant
20 throughout the experiment. A linear flow velocity of 153 cm/h is used for all solutions that are passed through the column. The adjustable outlet of the column is placed approximately 1 cm above the expanded bed. Commercial baker's yeast is added to equilibration buffer to give an optical density at 600 nm (O.D. 600) of 1.42, equivalent to 0.39 g/l dry wt. The cell-containing solution is pumped to the column and the liquid exiting
25 the column is collected in 2 ml fractions and analysed for yeast cell content by monitoring the optical density at 600 nm in a spectrophotometer.

Comments/conclusion:

No breakthrough of yeast cells is detected when 760 ml of buffer containing cells (0.30 g dry wt) was passed through the column. The dynamic breakthrough capacity of the UFC
30 (20–40 μ m) DEAE adsorbent for yeast cells under these conditions is therefore greater than 0.095 g dry wt. cells per ml of adsorbent.

Example 12

Yeast cell capture from fermentation medium using UFC DEAE (20–40 μ m) adsorbent
35 and step ionic strength gradient elution.

Equipment: FastLine™ 10 column (1 cm in diameter and 30 cm in height), Verder CD70 pump, magnetic stirrer, spectrophotometer.

- Method: Adsorbent: UFC DEAE (20–40 µm). The adsorbent is added to the column, which already contains a magnetic stirring bar. The adsorbent is washed and equilibrated
- 5 with 50 mM Tris/HCl pH 7.0 buffer for 2 hours at a linear flow velocity of 153 cm/h. The settled bed height is 3.9 cm corresponding to 3.05 ml adsorbent. The adsorbent is expanded to a height of 9.5 cm with equilibration buffer at a linear flow rate of 153 cm/h and the magnetic stirrer is started with a speed of 750 rpm, which is kept constant throughout the experiment. A linear flow velocity of 153 cm/h is used for all solutions
- 10 which are passed through the column. The adjustable outlet of the column is placed approximately 1 cm above the expanded bed. Sufficient commercial baker's yeast to give a dry weight (dry wt.) concentration of 0.52 g/l corresponding to an optical density at 600 nm (O.D. 600) of 1.82 is added to a defined fermentation medium containing mineral salts, glucose (10 g/l) and trace metals (Verduyn *et al.*, 1992, *Yeast*, 8: 501-517). The
- 15 yeast-containing medium (84 ml) is pumped through the column, the adsorbent is then washed with equilibration buffer during which the O.D. 600 reaches the baseline. Yeast cells are eluted from the adsorbent in a stepwise manner using equilibration buffer containing 0.5 M NaCl and in a subsequent elution step, with addition of equilibration buffer containing 1 M NaCl. The liquid exiting the column is collected in 2 ml fractions.
- 20 Comments/conclusion:
- Ten-percent breakthrough occurs after 10 ml of cell suspension is applied. The dynamic binding capacity determined at 10% breakthrough is 1.7 mg dry wt. cells per ml adsorbent. Application of buffer containing 0.5 M and 1 M NaCl results in elution of yeast cells (Fig. 5) from the UFC (20–40 µm) adsorbent bed.

CLAIMS

1. A particulate material having a density of at least 2.5 g/ml, where the particles of the particulate material have an average diameter of 5-75 μm , and the particles of the
- 5 particulate material are essentially constructed of a polymeric base matrix and a non-porous core material, said core material having a density of at least 3.0 g/ml, said polymeric base matrix including pendant groups which are positively charged at pH 4.0 or which are affinity ligands for a bio-molecule.
- 10 2. A material according to claim 1, wherein the average diameter of the particles is in the range of 10-60 μm , such as in the range of 12-49 μm , preferable in the range of 20-40 μm .
3. A material according to any of the preceding claims, wherein at least 95% of the
- 15 particles have a diameter in the range of 5-80 μm , such as 15-45 μm , preferably in the range of 20-40 μm .
4. A material according to any of the preceding claims, wherein the density of the particles is at least 3.0, such as at least 3.5, preferably in the range of 3.5-10.0 g/ml.
- 20 5. A material according to claim 1, wherein the pendant groups comprise chargeable moieties selected from polyethyleneimine, modified polyethyleneimine, poly(ethyleneimine/oxyethylene), quaternary aminoethyl (QAE) and diethylaminoethyl, (DEAE).
- 25 6. A material according to claim 5, wherein the pendant groups are polyethyleneimine chains having an weight average molecular weight of at least 10,000 D, such as 10,000-200,000 D.
- 30 7. A material according to claim 5 or 6, wherein the pendant groups form a tentacular structure on the surface of the particle.
8. A material according to any of the preceding claims, wherein the core material has a density in the range of 6.0-12.0 g/ml.

9. A material according to any of the preceding claims, wherein the core material of at least 95% of the particles is a steel bead having a diameter in the range of 2-40 μm , such as 15-38 μm , preferably 15-35 μm .
- 5 10. A material according to any of the preceding claims, wherein at least 95% of the particles comprises one non-porous core material bead having a diameter which is at least 0.70, such as at least 0.80, preferably at least 0.85, of the diameter of the particle.
11. A material according to any of the claims 1-8, wherein the core material is constituted
10 by more than one bead.
12. A material according to any of the preceding claims, wherein the core material constitutes 10-99%, preferably 50-95%, of the volume of the particles, and the polymer base matrix constitutes 1-90%, preferably 5-50%, of the volume of the particle.
- 15 13. A material according to any of the preceding claims, wherein the polymeric base matrix is selected from polysaccharides, preferably agarose.
14. A material according to any of the preceding claims, wherein at least 95% of the
20 particles are substantially spherical.
15. A particulate material having a density of in the range of 3.2-5.0 g/ml, where the particles of the particulate material have an average diameter of 15-45 μm , and the particles of the particulate material are essentially constructed of a polysaccharide base
25 matrix and a core material, said core material having a density in the range of 6.0-12.0 g/m³, said polysaccharide base matrix including pendant chains of polyethyleneimine, modified polyethyleneimine or poly(ethyleneimine/oxyethylene), said pendant groups forming a tentacular structure on the surface of the particle.
- 30 16. A method for the isolation or purification of a bio-macromolecule, wherein said bio-macromolecule is adsorbed to a particulate material as defined in any of the claims 1-15.
17. A method according to claim 16, wherein the particulate material is present in fluidised
35 form in a fluid bed column.

18. A method for the purification of bio-macromolecule, the method comprising the steps of

5 (a) contacting a feedstock comprising one or more bio-macromolecules with a fluidised bed of a particulate material as defined in any of the claims 1-15;

(b) optionally washing the particulate material in order to separate impurities from the particulate material and the bio-macromolecule(s); and

10

(c) eluting the bio-macromolecule(s) from the particulate material.

19. A method according to claim 18, wherein the fluidised bed of the particulate material is washed with an equilibration buffer prior to contacting with the feedstock.

15

20. A method according to claim 18 or 19, wherein the concentration of the bio-macromolecule in the feedstock is in the range of 0.1-3,000 µg/ml.

21. A method according to claim 20, wherein the feedstock comprising the bio-
20 macromolecule(s) furthermore comprises NaCl in a concentration of 0.01-2.0 M.

22. A method according to claim 20 or 21, wherein the feedstock comprising the bio-macromolecule(s) furthermore comprises a buffer whereby the pH is in the range of 4.0-8.0.

25

23. A method according to any of the claims 18-22, wherein the ratio between the bio-macromolecule and the particulate material (adsorbent) is in the range of 0.1-7.0 mg bio-macromolecule/ml adsorbent.

30 24. A method according to any of the claims 18-23, wherein the macromolecule has a molecular weight of at least 20,000.

25. A method according to any of the claims 18-24, wherein the particulate material having adsorbed thereto the bio-macromolecule is washed (step b) with an aqueous
35 equilibration buffer including NaCl.

26. A method according to any of the claims 18-25, wherein the particulate material having adsorbed thereto the bio-macromolecule is eluted with a NaCl gradient and/or NaOH buffer.

5

27. A method according to any of the claims 18-26, wherein the fluidised bed is a stabilised expanded bed without significant back-mixing.

28. A method according to any of the claims 18-27, wherein the particulate material is a
10 defined in claim 15.

29. A method according to any of the claims 18-28, wherein the bio-macromolecule is a nucleic acid.

15 30. A method according to claim 29, wherein the nucleic acid is plasmid DNA.

31. The use of a particulate material as defined in any of the claims 1-15 for use in chromatographic processes.

1/5

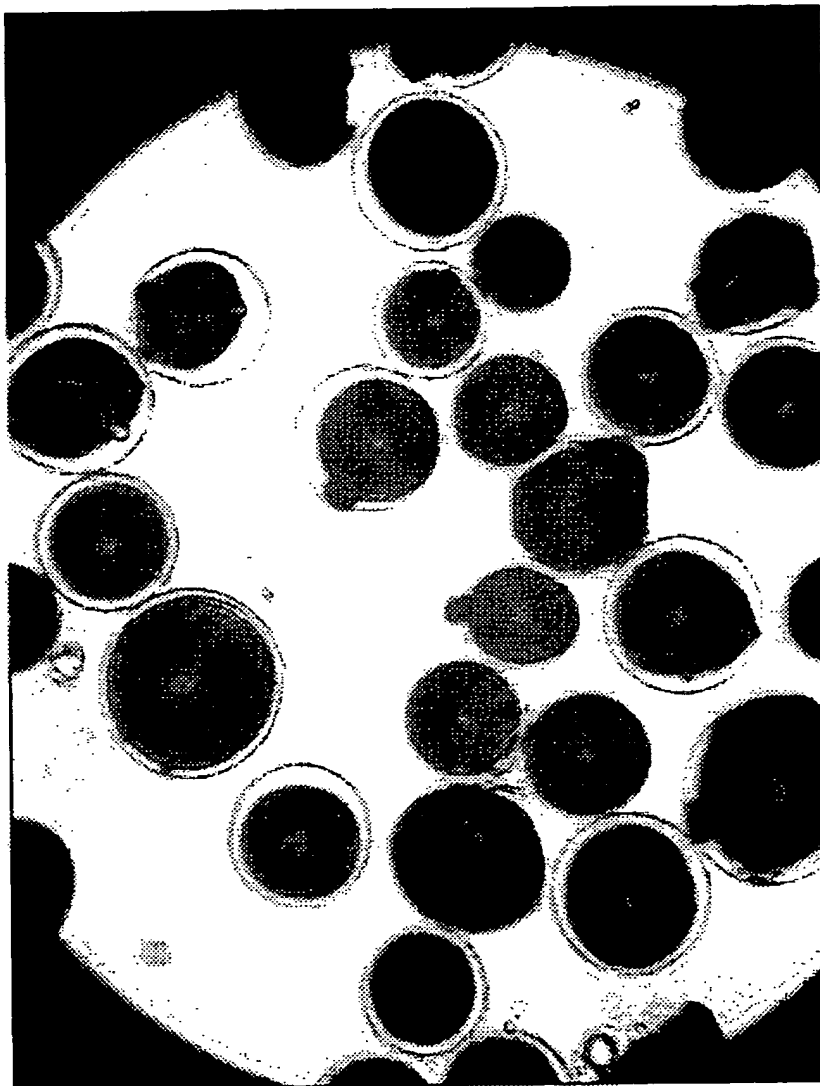


FIGURE 1

FIGURE 1

2/5

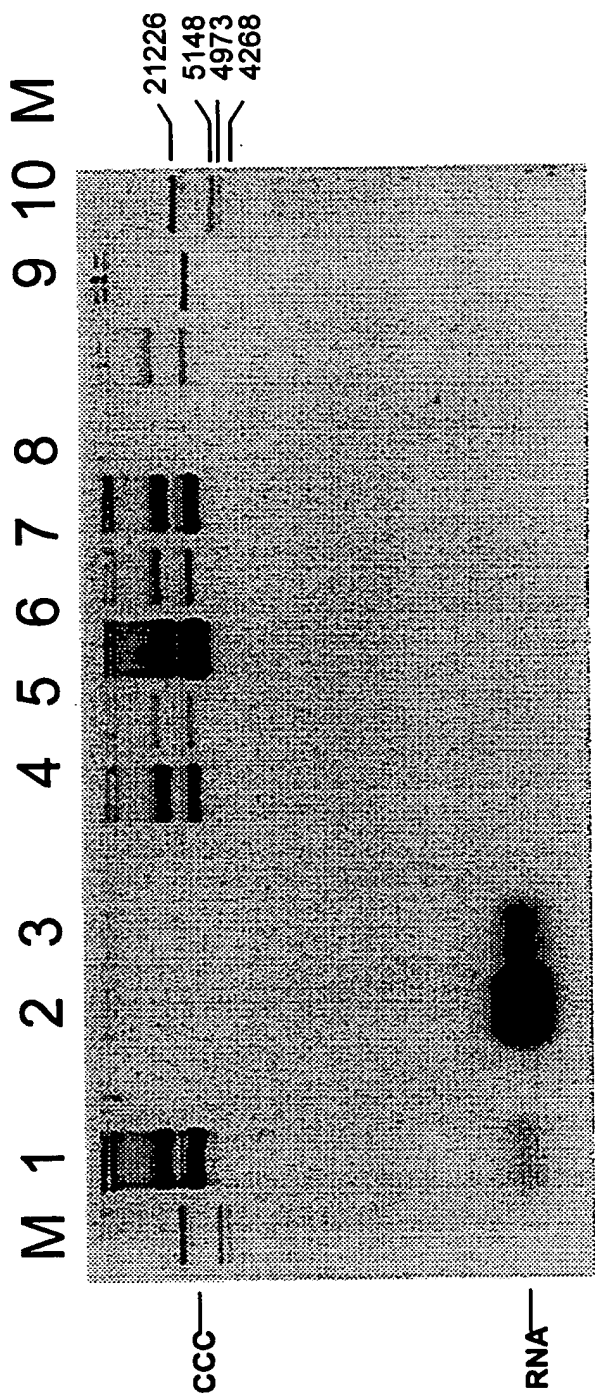


FIGURE 2

FIGURE 2

3/5

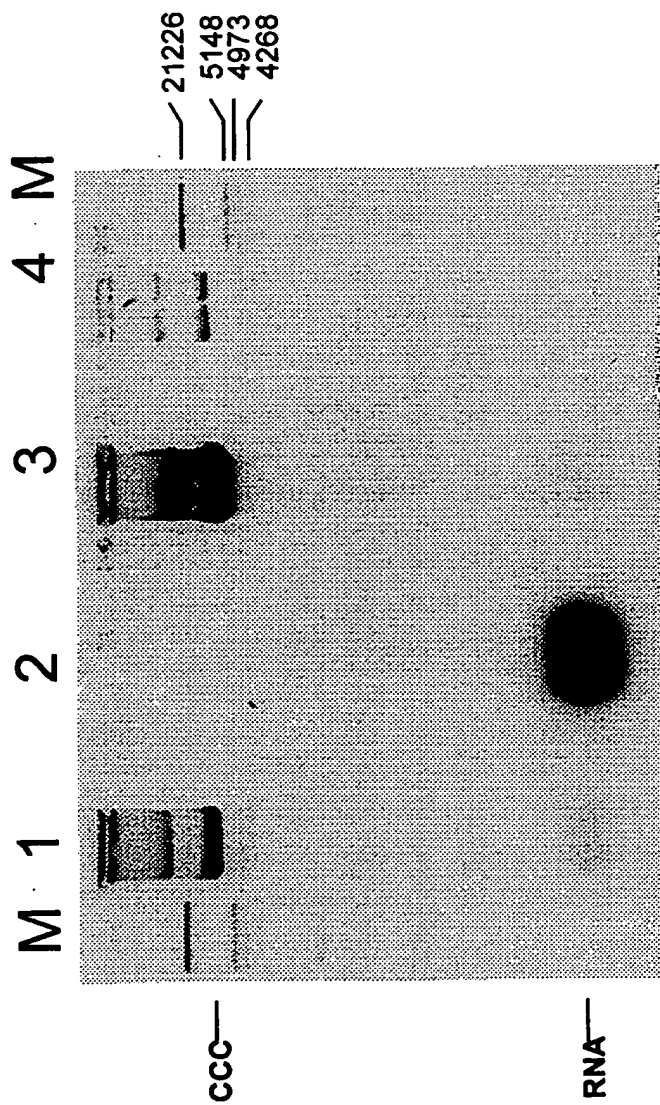


FIGURE 3

FIGURE 3

4/5

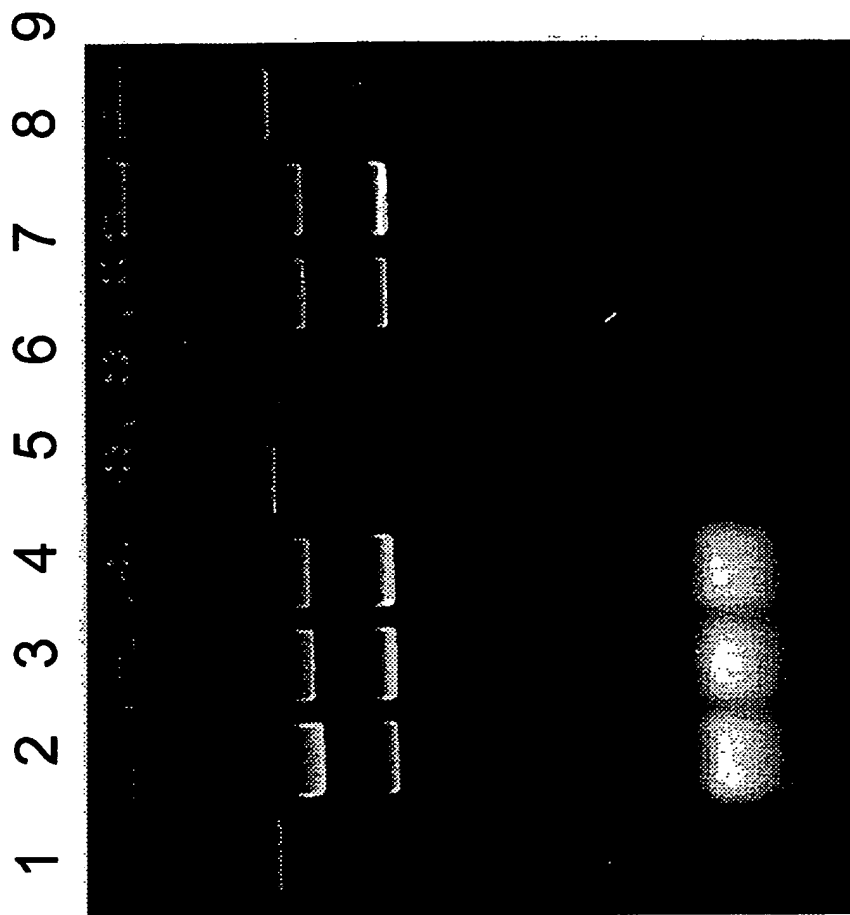


FIGURE 4

FIGURE 4

5/5

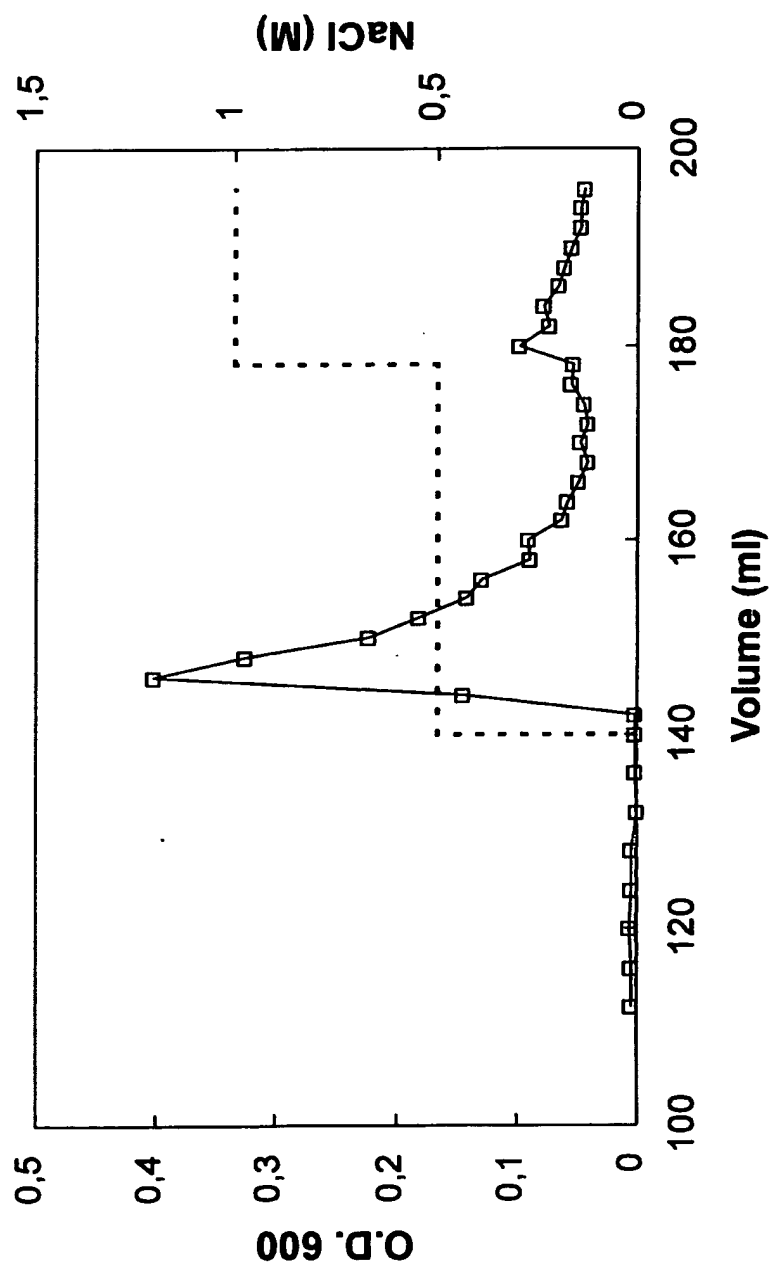


FIGURE 5

FIGURE 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK 00/00142

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7: B01D 15/00, G01N 30/48 // B01J 20/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: B01D, G01N, B01J, C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | WO 9717132 A1 (PHARMACIA BIOTECH AB), 15 May 1997 (15.05.97), page 6, line 9 - page 7, line 39, claims 4,5,6,7, abstract -- | 1-31 |
| A | WO 8603136 A1 (UNIVERSITY PATENTS, INC.), 5 June 1986 (05.06.86), abstract -- | 1-31 |
| A | WO 9200799 A1 (KEM-EN-TEC A/S), 23 January 1992 (23.01.92), abstract -- ----- | 1-31 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2000

Date of mailing of the international search report

08.09.2000

Name and mailing address of the International Searching Authority
European Patent Office P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Moa Grönkvist/MP
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

08/05/00

International application No.
PCT/DK 00/00142

| Patent document cited in search report | | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|---|---------|----|---------------------|----------------------------|--------------|---------------------|
| WO | 9717132 | A1 | 15/05/97 | AU | 7593196 A | 29/05/97 |
| | | | | CA | 2236875 A | 15/05/97 |
| | | | | EP | 0861119 A | 02/09/98 |
| | | | | JP | 2000500063 T | 11/01/00 |
| | | | | SE | 9503926 D | 00/00/00 |
| ----- | | | | | | |
| WO | 8603136 | A1 | 05/06/86 | EP | 0203163 A | 03/12/86 |
| | | | | JP | 62501196 T | 14/05/87 |
| | | | | US | 4675113 A | 23/06/87 |
| | | | | US | 5167811 A | 01/12/92 |
| | | | | US | 5167812 A | 01/12/92 |
| ----- | | | | | | |
| WO | 9200799 | A1 | 23/01/92 | AT | 143139 T | 15/10/96 |
| | | | | AT | 143288 T | 15/10/96 |
| | | | | AT | 185089 T | 15/10/99 |
| | | | | AU | 659090 B | 11/05/95 |
| | | | | AU | 8219591 A | 04/02/92 |
| | | | | CA | 2086752 A | 10/01/92 |
| | | | | CA | 2259061 A | 10/01/92 |
| | | | | CA | 2259062 A | 10/01/92 |
| | | | | DE | 69122271 D,T | 24/04/97 |
| | | | | DE | 69122393 D,T | 24/04/97 |
| | | | | DE | 69131670 D | 00/00/00 |
| | | | | DK | 165090 D | 00/00/00 |
| | | | | DK | 538350 T | 06/10/97 |
| | | | | DK | 607998 T | 17/03/97 |
| | | | | EP | 0538350 A,B | 28/04/93 |
| | | | | EP | 0607998 A,B | 27/07/94 |
| | | | | EP | 0722771 A,B | 24/07/96 |
| | | | | EP | 0976447 A | 02/02/00 |
| | | | | EP | 0978311 A | 09/02/00 |
| | | | | ES | 2094572 T | 16/01/97 |
| | | | | ES | 2095944 T | 01/03/97 |
| | | | | HU | 67261 A | 28/03/95 |
| | | | | JP | 6505911 T | 07/07/94 |
| | | | | US | 5866006 A | 02/02/99 |
| | | | | US | 5935442 A | 10/08/99 |
| | | | | US | 6043067 A | 28/03/00 |
| ----- | | | | | | |

CLAIMS

1. A method for purifying a crude viral preparation containing viral particles of interest,
5 characterized in that it comprises at least one fluidized-bed adsorption step.
2. The method as claimed in claim 1, characterized in that said fluidized bed contains particles of
10 adsorbent and is obtained by suspending said particles in a fluid under the action of one or more forces selected from mechanical, electromagnetic, magnetic, gravitational and electrical forces.
- 15 3. The method as claimed in claim 2, characterized in that said particles of adsorbent consist of polymer, and more particularly of a polymer chosen from agarose, polyacrylamide, polystyrene or
20 derivatives thereof.
4. The method as claimed in claim 2 or 3, characterized in that said particles of adsorbent bear at least one ligand capable of binding
25 specifically and reversibly to an antiligand, said antiligand consisting of all or part of a said viral particle of interest.
- 30 5. The method as claimed in claim 4, characterized in that said ligand consists of a positively charged group, advantageously a basic group, and more particularly a group selected from the
35 dimethylaminoethyl (DMAE) group, the diethylaminoethyl (DEAE) group, the trimethylaminoethyl (TMAE) group, the group $-R-CH(OH)-CH_2-N^+-(CH_3)_3$ (Q group), the guanidinium group or the imine group, such as polyethyleneimine (PEI).

6. The method as claimed in one of claims 2 to 5, characterized in that said particles of adsorbent consist of an agarose matrix and comprise a central core made of quartz and dextran chains covalently coupled to said agarose matrix, on which is attached said positively charged group and, in particular, the Q group.
7. The method as claimed in any one of claims 1 to 6, characterized in that it is carried out under conductivity conditions of between approximately 25 and approximately 70 mS/cm, advantageously between approximately 30 and approximately 40 mS/cm, and preferably between approximately 30 and approximately 35 mS/cm.
8. A protocol for producing viral particles which can be used for gene therapy, comprising the following steps (i) and (ii):
- (i) production of a crude viral preparation, comprising the steps:
- (a) infecting or transfecting a suitable cell line with at least one viral vector of interest, preferably a recombinant viral vector of interest;
- (b) culturing said infected or transfected cell line under conditions which allow viral replication and the production of viral particles;
- (c) collecting the cells and/or the supernatant,
- (ii) purification of said crude viral preparation according to one of the methods of claims 1 to 7.
9. The protocol as claimed in claim 8, characterized in that it also comprises:
- (i) a cell rupture or lysis step after step (c), optionally followed by a step for degrading the nucleic acids,

(ii) a step for inactivating enveloped viruses,
and/or

(iii) a packed-bed chromatography step, and in
particular a gel filtration chromatography step.

5

10. The method as claimed in one of claims 1 to 7 or
the protocol as claimed in claim 8 or 9,
characterized in that said viral particles are
adenoviral particles.

10

AMENDED CLAIMS

[Received by the International Office on July 25, 2000
(07.25.00); claim 3 added; other claims unchanged (3 pages)]

- 5 1. A method for purifying a crude viral preparation containing viral particles of interest, characterized in that it comprises at least one fluidized-bed adsorption step.
- 10 2. The method as claimed in claim 1, characterized in that said fluidized bed contains particles of adsorbent and is obtained by suspending said particles in a fluid under the action of one or more forces selected from mechanical, 15 electromagnetic, magnetic, gravitational and electrical forces.
3. The method as claimed in claim 2, comprising:
- 20 a) a phase for expanding said particles of adsorbent in a chromatography column, in particular by applying an ascending flow of buffer, said expansion phase being maintained until a fluidized bed is obtained,
- 25 b) a phase for loading said crude viral preparation, in particular in the lower part of said column,
- 30 c) a phase for washing by passing a buffer through, in particular in an ascending flow,
- d) a phase for sedimentation, optionally aided by a descending flow of buffer,
- 35 e) a step for elution by applying a flow of buffer, in particular a descending flow, in order to allow the release of the viral particles adsorbed onto said particles of adsorbent.

4. The method as claimed in claim 2 or 3, characterized in that said particles of adsorbent consist of polymer, and more particularly of a polymer chosen from agarose, polyacrylamide, polystyrene or derivatives thereof.
5. The method as claimed in one of the preceding claims, characterized in that said particles of adsorbent bear at least one ligand capable of binding specifically and reversibly to an antiligand, said antiligand consisting of all or part of a said viral particle of interest.
6. The method as claimed in claim 5, characterized in that said ligand consists of a positively charged group, advantageously a basic group, and more particularly a group selected from the dimethylaminoethyl (DMAE) group, the diethylaminoethyl (DEAE) group, the trimethylaminoethyl (TMAE) group, the group $-R-CH(OH)-CH_2-N^+-(CH_3)_3$ (Q group), the guanidinium group or the imine group, such as polyethyleneimine (PEI).
7. The method as claimed in one of claims 2 to 6, characterized in that said particles of adsorbent consist of an agarose matrix and comprise a central core made of quartz and dextran chains covalently coupled to said agarose matrix, on which is attached said positively charged group and, in particular, the Q group.
8. The method as claimed in any one of claims 1 to 7, characterized in that it is carried out under conductivity conditions of between approximately 25 and approximately 70 mS/cm, advantageously between approximately 30 and approximately

40 mS/cm, and preferably between approximately 30 and approximately 35 mS/cm.

9. A protocol for producing viral particles which can
5 be used for gene therapy, comprising the following steps (i) and (ii):
(i) production of a crude viral preparation, comprising the steps:
(a) infecting or transfecting a suitable
10 cell line with at least one viral vector of interest, preferably a recombinant viral vector of interest;
(b) culturing said infected or transfected cell line under conditions which allow
15 viral replication and the production of viral particles;
(c) collecting the cells and/or the supernatant,
(ii) purification of said crude viral preparation
20 according to one of the methods of claims 1 to 8.
10. The protocol as claimed in claim 9, characterized in that it also comprises:
(i) a cell rupture or lysis step after step (c),
25 optionally followed by a step for degrading the nucleic acids,
(ii) a step for inactivating enveloped viruses, and/or
(iii) a packed-bed chromatography step, and in
30 particular a gel filtration chromatography step.
11. The method as claimed in one of claims 1 to 8 or the protocol as claimed in claim 9 or 10,
35 characterized in that said viral particles are adenoviral particles.